

Aus dem Radiologiezentrum (Experimentelle
Nuclearmedizin) der Philipps-Universität in Marburg

QUANTITATIVE AUTORADIOGRAPHISCHE STUDIE
ÜBER DAS
HETEROZYKLISCHE X-CHROMOSOM DER FRAU

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

HERMANN GUNDLACH

aus Marburg/Lahn

Marburg 1974

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Radiologiezentrum (Experimentelle
Nuclearmedizin) der Philipps-Universität in Marburg

QUANTITATIVE AUTORADIOGRAPHISCHE STUDIE
ÜBER DAS
HETEROZYKLISCHE X-CHROMOSOM DER FRAU

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

HERMANN GUNDLACH

aus Marburg/Lahn

Marburg 1974

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 5.4.1974
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. H. Oepen
Referenten:	Dr. med. S. Stengel-Rutkowski
	Prof. Dr. E. Schaumlöffel
Correferent:	Prof. Dr. med. G. Wendt

Mein Dank gilt

Frau Dr. med. S. Stengel-Rutkowski für die Überlassung des Themas und für die Übernahme des Referates sowie für die Einführung in die Problematik und Methodik, für die Leitung der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E. Schaumlöffel für die Ermöglichung der Anwendung von Isotopen und der Auswertung des Untersuchungsmaterials mittels einer Meßeinheit zur quantitativen Bildanalyse.

Herrn Prof. Dr. G. Wendt für die Übernahme des Correferates.

Herrn Dr. E. Hausert, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, für Führung und Beratung bei der statistischen Bearbeitung des Materials.

Weiterhin danke ich Frau Matwijuk für Beratung und Hilfe bei den Ausführungen Photographischer Arbeiten.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1:	<u>E I N L E I T U N G</u>	1
2:	<u>L I T E R A T U R Z U R X - C H R O M O -</u> <u>S O M A L E N H E T E R O Z Y K L I E</u>	3
21:	<u>REGULATION DER CHROMOSOMALEN REPLIKATION</u>	3
22:	<u>AUTORADIOGRAPHISCHE METHODE ZUR UNTER-</u> <u>SUCHUNG DES CHROMOSOMALEN REPLIKATIONS-</u> <u>ABLAUFES</u>	4
23:	<u>ENTDECKUNG DER X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE</u>	5
24:	<u>DAS HETEROZYKLISCHE X-CHROMOSOM IN INTER-</u> <u>PHASEKERNEN</u>	6
25:	<u>GENETISCHE INAKTIVITÄT DES HETEROZYKLISCHEN</u> <u>X-CHROMOSOMS</u>	7
3:	<u>P R O B L E M S T E L L U N G</u> <u>KONSTANZ ODER VARIABILITÄT DER HETEROZYKLIE</u> <u>NORMALER X-CHROMOSOMEN VERSCHIEDENER WEIB-</u> <u>LICHER INDIVIDUEN</u>	10
4:	<u>M A T E R I A L U N D M E T H O D I K</u>	11
41:	<u>PROBANDENMATERIAL</u>	11
42:	<u>CHROMOSOMENPRÄPARATION</u>	11
42-1	MATERIALGEWINNUNG	11
42-2	KULTUR	11
42-3	MARKIERUNG	11
42-4	PRÄPARATION	11
42-5	AUTORADIOGRAPHIE	13
42-6	ENTWICKELN UND FIXIEREN DES AUTORADIO- <u>GRAPHISCHEN FILMES</u>	13
43:	<u>AUSWAHL DER UNTERSUCHTEN ZELLEN</u>	14
44:	<u>MESSMETHODIK</u>	15
44-1	GERÄTBESCHREIBUNG	15
44-2	MESSPRINZIP	18
44-3	DURCHFÜHRUNG DER MESSUNGEN	19

	Seite
44-4	MESSGENAUIGKEIT 23
44-41	Gerätefehler 23
44-42	Reproduzierbarkeit der apparativen Flächen- messung 25
44-43	Reproduzierbarkeit der visuellen Körner- zählung 26
45:	<u>CHARAKTERISIERUNG DES MESSPRINZIPS</u> 26
46:	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> 30
5:	<u>ERGEBNISSE</u> 31
51:	<u>VERGLEICH DER X-CHROMOSOMALEN UND AUTO- SOMALEN MARKIERUNG EINZELNER ZELLEN BEI 15 WEIBLICHEN INDIVIDUEN</u> 31
52:	<u>HOMOGENITÄTSPRÜFUNG FÜR DIE X-CHROMOSO- MALE HETEROZYKLE ALLER INDIVIDUEN</u> 40
53:	<u>ZUSAMMENFASSUNG IN 3 ALTERSGRUPPEN</u> 41
53-1	MITTLERE X-CHROMOSOMALE MARKIERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM MARKIERUNGSGRAD DER AUTOSOMEN 41
53-2	LINEARE REGRESSION 45
53-21	Korrelationskoeffi- zient r 45
53-22	Achsenabschnitt a 45
53-23	Steigung 48
53-24	Lineare Regression der Mittelwerte der 3 Altersgruppen 48

54:	HOMOGENITÄTSPRÜFUNG INNERHALB DER 3 ALTERSGRUPPEN	48
55:	ÜBERPRÜFUNG DER ERGEBNISSE MIT HILFE DES HETEROZYKLIEQUOTIENTEN $X: (2n-X)$	50
6:	D I S K U S S I O N	
61:	<u>BISHER DURCHGEFÜHRTE QUANTITATIVE UNTER- SUCHUNGEN DER X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE</u>	54
61-1	BESTIMMUNG DER SILBERKORNZAHLEN ÜBER DEM X-CHROMOSOM, BEZOGEN AUF DEN MARKIERUNGS- GRAD DER AUTOSOMEN ($2n-X$)	54
61-2	VERGLEICHENDE BESTIMMUNG DER DNS-SYNTHE- SERATE ÜBER X-CHROMOSOMEN UND AUTOSOMEN BEZOGEN AUF DEN ZEITPUNKT DER S-PHASE	56
61-3	UNTERSUCHUNG DER GESAMTEN REPLIKATIONS- DAUER DES X-CHROMOSOMS IM VERGLEICH ZU DEN AUTOSOMEN	57
61-4	UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KONSTANZ DER NORMALEN X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE	57
61-5	QUANTITATIVE UNTERSUCHUNG DES MARKIERUNGS- MUSTERS HETEROZYKLISCHER X-CHROMOSOMEN	58
61-6	ZUSAMMENFASSUNG	
62:	<u>KRITISCHE STELLUNGNAHME ZU DEN EIGENEN ERGEBNISSEN</u>	60
62-1	AUSWAHL DES PROBANDENMATERIALS	60
62-2	ZEITPUNKT DES KULTURANSATZES	62
62-3	INDIVIDUELLE VARIANTEN	63
62-4	EINFLUSS VON PHA UND SCHWANKUNGEN IN DER DAUER DER G_2 -PHASE	63
62-5	QUANTITATIVE CHROMOSOMENAUTORADIO- GRAPHIE	64

62-51	B - S t r a h l u n g	64
62-52	I n k o r p o r a t i o n v o n $3H$ - T h y m i d i n i n d i e c h r o m o s o m a l e D N S	66
62-53	B e d e u t u n g d e r C h r o m o - s o m e n s t r u k t u r f ü r d i e q u a n t i t a t i v e A u t o r a d i o - g r a p h i e	67
62-54	S t r i p p i n g f i l m	69
62-55	E x p o s i t i o n s z e i t	70
62-56	E n t w i c k l u n g	71
62-57	Z u s a m m e n f a s s u n g	71
62-6	D I S K U S S I O N D E R M E S S M E T H O D I K	72
62-61	K ö r n e r z ä h l u n g	72
62-62	M i k r o p h o t o m e t r i e	73
62-63	F e r n s e h m i k r o s k o p i e	75
62-64	Z u s a m m e n f a s s u n g	77
62-7	M E S S W E R T V E R A R B E I T U N G	79
63:	<u>M O G L I C H E B E D E U T U N G E I N E R V A R I A B L E N A U S - P R Ä G U N G D E R X - C H R O M O S O M A L E N H E T E R O Z Y K L I E</u>	80
63-1	H E T E R O Z Y K L I E U N D I N A K T I V I T Ä T D E S X - C H R O M O S O M S	80
63-2	H I N W E I S F Ü R E I N E H O R M O N E L L E S T I M U L I E R U N G X - C H R O M O S O M A L E R S Y N T H E S E V O R G Ä N G E	82
7:	<u>Z U S A M M E N F A S S U N G</u>	

CHROMOSOMENSATZ VON MANN UND FRAU

Autosomen		Geschlechtschromosomen	
♀	2 · 22	X	X
♂	2 · 22	X	Y

Fig. 1

1: EINLEITUNG

Der Chromosomensatz des Menschen besteht aus 22 Chromosomenpaaren, den sogenannten Autosomen, und den beiden Geschlechtschromosomen, zwei X-Chromosomen bei der Frau und einem X- und Y-Chromosom beim Mann. Die Autosomen und ein X-Chromosom sind zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht morphologisch nicht zu unterscheiden, und vermutlich auch gentisch gleichwertig. Man rechnet aus diesem Grund das eine, beiden Geschlechtern gemeinsame X-Chromosom vielfach zu den Autosomen (Fig. 1). Die vorliegende Untersuchung gilt dem zweiten X-Chromosom der Frau, das dem männlichen Y-Chromosom gegenübersteht. Es unterscheidet sich von den Autosomen und dem ersten X-Chromosom sowohl durch einen anderen Kondensationszustand während der Interphase (Heterochromasie), als auch durch einen anderen Replikationszeitpunkt vor der

Zellteilung (Meterozyklie).

Anhand eines größeren menschlichen Untersuchungsgutes soll geklärt werden, ob es sich bei diesem heterozyklischen Verhalten, das vielfach mit einer für das X-Chromosom postulierten genetischen Inaktivität in Zusammenhang gebracht wird, um eine in ihrer Ausprägung konstante oder variable Eigenschaft dieses Chromosoms handelt.

Die Auswertung der Chromosomenautoradiographien wurde erstmals mithilfe einer Meßeinheit zur quantitativen Bildanalyse, dem CLASSIMAT durchgeführt, der von der Firma LEITZ, Wetzlar, entwickelt, und uns dankenswerterweise für kurze Zeit zur Verfügung gestellt wurde.

2: LITERATUR ZUR X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE

21: REGULATION DER CHROMOSOMALEN REPLIKATION

Die chromosomale Replikation folgt einer strengen Gesetzmäßigkeit, deren Kontrollmechanismen bis heute noch nicht nachgewiesen werden konnten. Man vermutet, daß bestimmte "startloci" auf den einzelnen DNS-Strängen verteilt sind, die möglicherweise über die Kernmembran den Befehl zur Verdopplung einer ihnen zugeordneten Sequenz erhalten (HUBERMAN und RIGGS, 1968; COMINGS 1968).

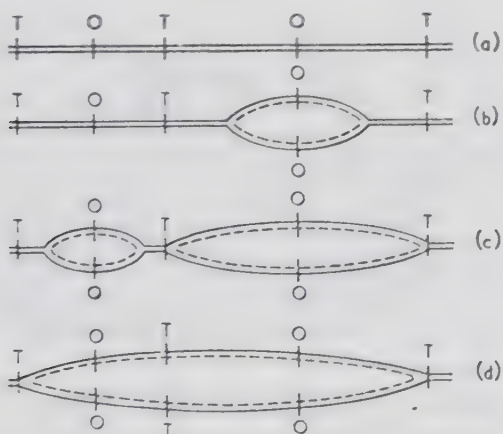


Fig. 2: HUBERMAN und RIGGS (1968): Schema der chromosomalen Replikation

====: DNS-Doppelhelix; ----: neu synthetisierte Polynucleotidkette; O: Replikationsbeginn; T: Replikationsende; a-d: verschiedene Stadien der DNS-Replikation zweier benachbarter Replikationseinheiten: a) vor Replikation; b) Replikationsbeginn rechts; c) Replikationsende rechts, Replikationsbeginn links; d) Replikationsende beider Einheiten, Trennung der neu syntetisierten Doppelhelices am gemeinsamen Endpunkt T.

22: AUTORADIOGRAPHISCHE METHODE ZUR UNTERSUCHUNG DES CHROMOSOMALEN REPLIKATIONSABLAUFS

1957 wurde von TAYLOR et al. erstmals Tritium markiertes Thymidin zur autoradiographischen Untersuchung der chromosomalen DNS-Replikation angewandt.

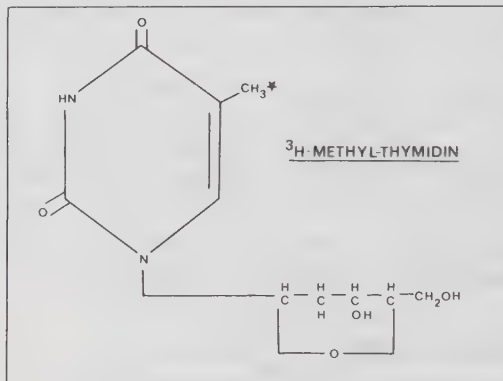


Fig. 3

Der Einbau des radioaktiven Bausteins in die Chromosomen kann in der auf die Replikation folgenden Teilungsphase durch punktförmige Schwärzung eines photographischen Filmes sichtbar gemacht werden.

Solche autoradiographischen Untersuchungen zeigten, daß sich die Chromosomen höherer Organismen nicht, wie aus der Bakteriengenetik bekannt, kontinuierlich von einem zum anderen Ende hin verdoppeln (JACOB et al. 1963), sondern daß die DNS-Replikation an voneinander unabhängigen Stellen beginnt und beendet wird. Die dadurch entstehenden Replikationsmuster am Ende der DNS-Syntheseperiode sind im allgemeinen konstant und können zur Identifizierung einzelner Chromosomen herangezogen werden (LIMA de FARIA et al. 1961; GILBERT et al. 1962; GERMAN 1962; KIKUCHI und SANDBERG 1964; BADER et al. 1963; SCHMID 1963; BIANCHI und de BIANCHI 1965; BUCHNER et al. 1968; PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA und SLEZINGER 1968; OCKEY 1969, CALDERON und SCHNEIDL 1973).

23: ENTDECKUNG DER X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE

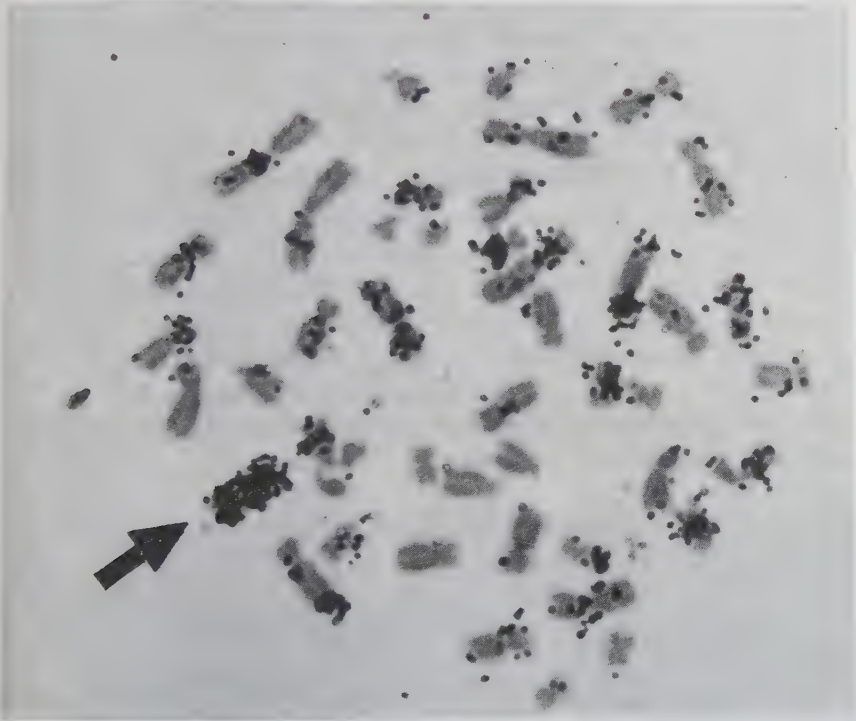


Abb. 1: ³H-Thymidin-Autoradiographie einer menschlichen Metaphaseplatte zu einem späten Zeitpunkt der DNS-Replikation. Starke Syntheseaktivität über dem heterozyklischen X-Chromosom (Pfeil).

Seit Einführung der Autoradiographie in die Humanzytogenetik ist bekannt, daß ein X-Chromosom in weiblichen Somazellen seine DNS zu einem späteren Zeitpunkt synthetisiert als alle anderen Chromosomen (MORISHIMA et al. 1962; GERMAN 1962; GILBERT 1962; MOORHEAD und DEFENDI 1963; ROWLEY et al. 1963; GIANNELLI 1963; GRUMBACH et al. 1963; KIKUCHI und SANDBERG 1965; PETERSON 1964; HSU und LOCKHART 1964). Dieses sogenannte "heterozyklische" X-Chromosom wird aufgrund des autoradiographischen Bildes auch häufig als "heiß", "differentiell

markiert", "spät synthetisierend", oder "out of phase" bezeichnet. Je näher das Ende der DNS-Syntheseperiode kommt, umso deutlicher wird die relative Differenz zwischen der Markierung dieses X-Chromosoms und allen anderen Autosomen, einschließlich des zweiten X-Chromosoms.

24: DAS HETEROZYKLISCHE X-CHROMOSOM IN INTERPHASEKERNEN

In Interphasekernen liegt dieses heterozyklische X-Chromosom der Frau häufig in einem kondensierten Zustand direkt der Kernmembran an, während alle anderen Chromosomen entspiralisiert sind. Es ist in diesem Zustand im Gegensatz zu den anderen Chromosomen mit basischen Farbstoffen dunkel anfärbbar (Heterochromasie). Bei Kerngeschlechtsbestimmungen dient es aufgrund dieses besonderen Verhaltens als Indikator für das weibliche Geschlecht (Sexchromatin, BARR und BERTRAM 1949).

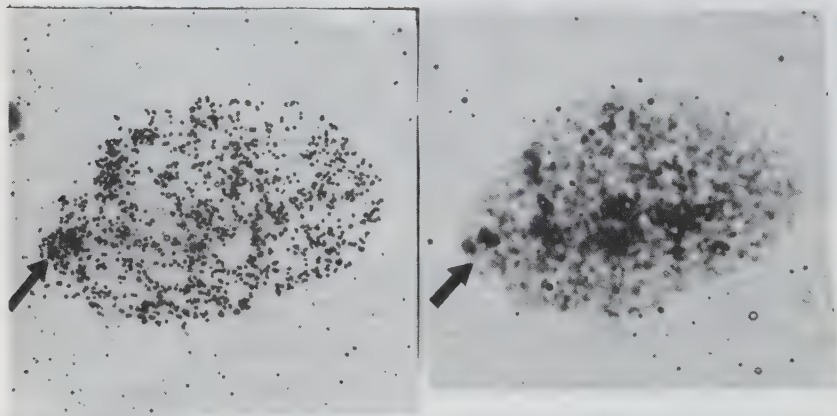


Abb. 2: Anhäufung von Silberkörnern über dem heterozyklischen X-Chromosom (Pfeil) in Interphasekernen (Sex-Chromatin). Weiblicher Fibroblast; a) Autoradiographie; b) die gleiche Zelle nach Entfernung der Silberkörner. Färbung: Karbolfuchsin. Negativ-Vergr. 512 mal.

25: GENETISCHE INAKTIVITÄT DES HETEROZYKLISCHEN X-CHROMOSOMS

Die eigentliche Ursache dieser X-chromosomalen Heterozyklie (bzw. Heterochromasie) ist nicht bekannt. Sie wird im allgemeinen mit einer auf genetischen Beobachtungen an der Maus beruhenden Hypothese von LYON (1961, 1962, 1963) in Verbindung gebracht, die besagt, daß ein X-Chromosom weiblicher Individuen zu einem frühembryonalen Zeitpunkt irreversibel inaktiviert wird.

Die Geschlechtschromosomen stammen entwicklungsgeschichtlich von einem gewöhnlich Autosomenpaar ab (OHNO 1967). Das Y-Chromosom sonderte sich im Laufe der Evolution von seinem homologen Partner durch Verlust der autosomalen, sog. MENDEL'schen Gene und Ansammlung reiner geschlechtsbestimmender Faktoren ab. Das X-Chromosom blieb in seiner ursprünglichen Größe erhalten. Es trägt also neben den erworbenen Faktoren zur Geschlechtsbestimmung noch seine aus der autosomalen Vergangenheit stammenden, sogenannten "geschlechtsgebundenen" Gene (MAC KUSICK 1964).

Um die aus der Differenzierung der Geschlechtschromosomen resultierende ungleiche Gendosis zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht auszugleichen, mußte sich ein Mechanismus zur Dosiskompensation (MULLER 1947) für X-chromosomale Gene entwickeln. Nach der LYON-Hypothese ist dieser Mechanismus durch die zufällige Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Somazellen erreicht worden.

Die Postulate der LYON-Hypothese lauten (LYON 1966):

- 1) In Zellen normaler weiblicher Säugerorganismen ist eines der beiden X-Chromosomen genetisch inaktiviert.
- 2) Das inaktivierte X-Chromosom kann in verschiedenen Zellen des gleichen Organismus väterlicher oder mütterlicher Herkunft sein.
- 3) Die Inaktivität tritt früh in der Embryonalentwicklung

auf und bleibt, wenn sie einmal aufgetreten ist, während der ganzen weiteren Entwicklung jeder Zelllinie bestehen.

Bis heute sind 4 Enzyme bekannt, deren Strukturgene auf das X-Chromosom lokalisiert werden:

- G-6-PDH = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (MARKS und GROSS 1959; KIRKMAN und HENDRICKSON 1963)
- PGK = Phospho-Glycerat-Kinase (VALENTINE et al 1969; PICARD et al. 1971; KHAN et al. 1971;
- HGPRT = Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyl-Transferase (NYHAN 1967; SEEGMILLER et al. 1967; HENDERSON et al. 1969).
- a-Galactosidase (SWEELY und KLIOWSKY 1963; KLINT 1970; GRZESCHIK et al 1972).

Die Gültigkeit der LYON-Hypothese konnte anhand von Aktivitätsbestimmungen dieser Enzyme mehrfach bestätigt werden (G-6-PDH: BEUTLER et al. 1962; DAVIDSON et al. 1963; BEUTLER und BALUDA 1964; MUKHERJEE und SINHA 1964; PGK: DEYS 1972; HGPRT: ROSENBLOOM et al. 1967; MIGEON et al. 1968; SALZMAN et al. 1968; a-Galactosidase: ROMEO und MIGEON 1971): In clonierten Fibroblastenkulturen von Frauen, die heterozygot für den Defekt eines dieser Enzyme sind, lassen sich Stammlinien mit normaler Enzymaktivität (normales X aktiv) neben solchen mit fehlender oder mutierter Enzymaktivität (krankes X aktiv) nachweisen.

Ähnliche Verhältnisse fanden FUDENBERG und HIRSCHHORN 1964 in Leukocytenkulturen von heterozygoten Frauen mit (X-gebundener) Agammaglobulinämie.

Auch histologische Untersuchungen an Muskulatur von klinisch gesunden Frauen, die heterozygot für die X-chromosomal vererbte progressive Muskeldystrophie (Typ DUCHENNE) sind, bestätigen die Gültigkeit der LYON-Hypothese, da Mosaik aus gesunden und kranken Fasern aufgefunden worden sind (EMERY 1963; PEARSON et al. 1963).

Ob der X-gebundene Blutgruppenlocus Xg ebenfalls der Inaktivierung unterliegt, ist heute noch umstritten (MANN et al. 1962; GORMAN et al. 1963; REED et al. 1963; COHEN et al. 1964; MAC DIARMID et al. 1967; FIALKOW 1970; DUCOS et al. 1971).

Es wird jedoch für möglich gehalten, daß es einige Loci auf dem menschlichen X-Chromosom gibt, die nicht inaktiviert sind (GRAY 1963; LYON 1966), bzw. die im späteren Leben partiell reaktiviert werden können (GOLDSTEIN 1972; MAC LAREN 1973, NURSE und JENKINS 1973).

In Keimzellen der Gonade sind beide X-Chromosomen aktiv, was durch Untersuchungen der G-6-PDH Aktivität bei der Maus (EPSTEIN 1969), sowie durch den Nachweis der Sexchromatin-Negativität belegt ist (OHINO et al. 1961, GRAY 1963).

3: PROBLEMSTELLUNG

KONSTANZ ODER VARIABILITÄT DER HETEROZYKLIE NORMALER X-CHROMOSOMEN VERSCHIEDENER WEIBLICHER INDIVIDUEN

Die Auffassung, daß Heterozyklie der morphologische Ausdruck von genetischer Inaktivität sei, ist zur Zeit allgemein akzeptiert. Tatsächlich konnte in den letzten Jahren eine enge Korrelation zwischen dem heterozyklischen Verhalten eines X-Chromosoms und seiner genetischen Inaktivität durch Enzymbestimmungen beim Maultier nachgewiesen werden (HAMERTON und GIANNELLI 1969; HAMERTON 1971; GIANNELLI und HAMERTON 1971; COHEN und RATTAZZI 1971; RATTAZZI und COHEN 1972; RAY et al. 1972).

Sollte jedoch ein ursächlicher Zusammenhang zwischen beiden X-chromosomalen Eigenschaften bestehen, so müßte Heterozyklie ebenso konstant und irreversibel sein wie Inaktivität. Schwankungen im Heterozyklieverhalten würden einer kausalen Beziehung zur Inaktivität widersprechen, oder aber die irreversible, bzw. komplette Inaktivität dieses Chromosoms in Frage stellen.

Ausgedehnte quantitative Studien der Heterozyklie normaler X-Chromosomen wurden bisher nicht durchgeführt. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, durch Untersuchung einer größeren Zahl weiblicher Individuen die Frage zu klären, ob es sich bei der X-chromosomalen Heterozyklie um eine "genetisch fixierte" Eigenschaft handelt, die bei verschiedenen Individuen innerhalb vergleichbarer Markierungsgrade konstant und durch "Normalkriterien" charakterisierbar ist, oder ob Schwankungen vorhanden sind, die auf funktionell variable Zustände dieses Chromosoms hinweisen könnten.

Da die konventionelle Methode der visuellen Silberkornzählung für größere Untersuchungen ungeeignet ist, wurde ein neues apparatives Verfahren angewendet. Die quantitative Auswertung von Chromosomenautoradiographien mit Hilfe der Fernsehmikroskopie soll als Teilproblem dieser Arbeit behandelt werden.

4: M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

41: PROBANDENMATERIAL

Die Chromosomenpräparationen stammten aus Lymphocytenkulturen von insgesamt 15 Probandinnen im Alter zwischen 8 Monaten und 58 Jahren. 4 von ihnen waren Patientinnen der Kinderklinik, 5 Patientinnen der Schilddrüsendiagnostik der nuklearmedizinischen Poliklinik der Universität Marburg. Die übrigen 6 Probandinnen waren Normalpersonen (Tab. 1).

42: CHROMOSOMENPRAPARATION

Die Chromosomen wurden nach einer geringfügig modifizierten Standardmethode von MOORHEAD et al. (1960) aus Makrokulturen präpariert:

42-1: MATERIALGEWINNUNG

10 ml heparinisiertes Venenblut, Sedimentation 1-4 Stunden. Bei ungenügender Sedimentation: Zentrifugieren bei 300 Upm, 5 min. Laborzentrifuge, $r = 15$ cm.

42-2: KULTUR

Inkubation des leukozytenreichen Überstandes (2-5 ml) mit 0,05 ml Phytohämagglutinin (PHA-P, DIFCO) und Medium TC 199. bzw. Mac COY, insgesamt 20 ml Kulturflüssigkeit. pH 7,2. Kulturdauer 72 Stunden. Temperatur 37° C.

3 Stunden vor Abbruch der Kultur: Zusatz von Colcemid (CIBA) (0,06 mg/ml).

42-3: MARKIERUNG

Methyl-tritium-Thymidin (Radiochemical Center, Amersham, England, spez. Akt 5 C/mM), Endkonzentration 1 uC/ml. Einwirkungsdauer 4 Stunden vor Abbruch der Kultur (continuous labelling)

42-4: PRÄPARATION

Hypotonische Behandlung der Zellen: Natrium-Citrat (3,8 %): aqua dest. = 1:3. Zentrifugieren 500 Upm/5 min. Fixieren in Eisessig/Methanol (1:3). 3 Fixierwechsel.

ÜBERSICHT DER ANALYSIERTEN KULTUREN

Nr.	Alter	Diagnose	Ausgewertete Metaphaseplatten	Insgesamt
1	8 Mon.	Pharyngitis, Dyspepsie, Rachitis	120	318
2	9 Mon.	BNS-Krämpfe	30	
3	12 Mon.	Enteritis	92	
4	30 Mon.	Spastische Bronchitis	76	
5	20 J.	Normalperson	33	372
6	22 J.	Normalperson	97	
7	23 J.	Normalperson	99	
8	24 J.	Normalperson	46	
9	25 J.	Normalperson	39	
10	26 J.	Normalperson	58	
11	50 J.	Zustand nach Radiojod- Therapie (euthyreot)	53	475
12	54 J.	Struma colli (euthyreot)	104	
13	55 J.	Zustand nach operiertem Schilddrüsen-Carzinom (euthyreot)	164	
14	56 J.	Struma colli diffusa (euthyreot)	41	
15	58 J.	Struma colli nodosa (hyperthyreot)	113	

Auftropfen der fixierten Zellsuspension aus ca. 30 cm Höhe auf gekühlte, fettfreie Objektträger. Trocknen in Heißluft. Färben in Orceinlösung: 1g Orcein in 60 ml Eisessig und 40 ml aqua dest. Färbedauer 60 min. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe.

42-5: AUTORADIOGRAPHIE

Vorbehandlung der Präparate mit Chromalaun-Gelatine zur besseren Haftung des Filmes (Vorschrift: GEY 1970). Aufziehen des KODAK AR 10 Strippingfilmes (5 u Dicke der empfindlichen Schicht, 10 u: Dicke der Gelatine-Trägerschicht): Der Film wird in der Dunkelkammer in ca. 4 mal 4 cm großen Stücken von der Glasplatte gelöst und mit der Schichtseite nach unten auf eine Wasseroberfläche gebracht. Dann wird der die Zellsuspension tragende Objektträger vorsichtig unter den schwimmenden Film geführt und ruckartig aus dem Wasser gehoben, sodaß der Film auf dem Objektträger haften bleibt und mit seiner empfindlichen Schicht die Zellen bedeckt. Nach Trocknung der Präparate 14-tägige Expositionszeit bei 4° C (Methode nach SCHMID 1965).

42-6: ENTWICKELN UND FIXIEREN DES AUTORADIOGRAPHISCHEN FILMES

- 1: Entwickeln 5 min. (KODAK D 19 b)
- 2: Neutralisieren in Leitungswasser
- 3: Fixieren 10 min. (TETENAL-SUPERFIX)
- 4: Wässern 5 min.
- 5: Trocknen 2 - 3 Stunden
- 6: Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
- 7: Eindecken in Eukitt.

43: AUSWAHL DER UNTERSUCHTEN ZELLEN

Da die DNS-Replikation einzelner mit Phytohamagglutinin stimulierter Lymphocyten nicht genau zum gleichen Zeitpunkt erfolgt, werden durch das radioaktive Thymidin unterschiedlich lange Abschnitte der späten S-Phase markiert. Man erhält ein Spektrum unterschiedlicher Markierungsintensitäten, die bestimmten Stadien der S-Phase entsprechen (Fig. 4).

Schema der Markierung unterschiedlich langer Abschnitte der späten S Phase (■) bei nicht vollständig synchronisierten Zellkulturen

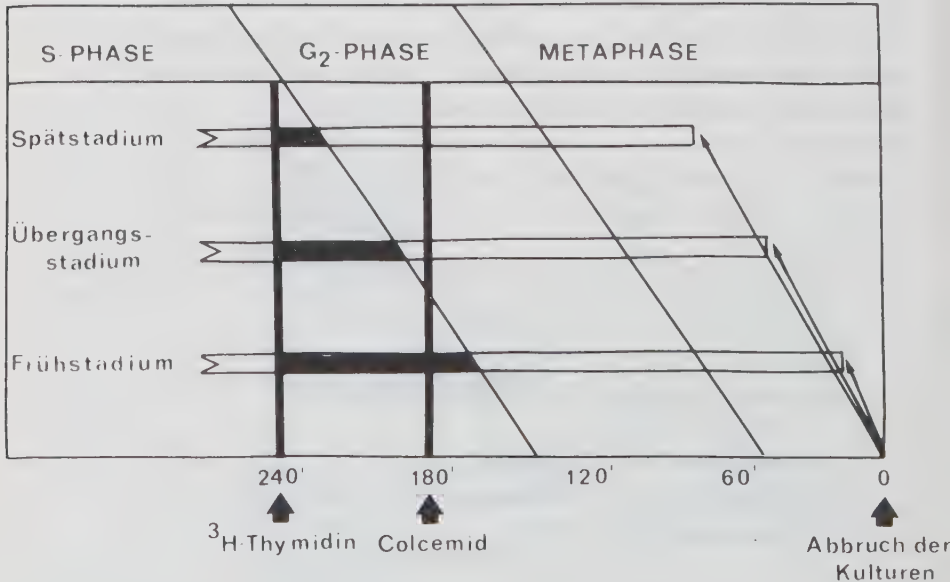


Fig. 4

Zellen in relativ frühen Stadien sind stark markiert und zur Auswertung wegen häufiger Silberkornüberlagerungen, und der Unmöglichkeit, das heterozyklische X-Chromosom mit Sicherheit zu erkennen, vielfach ungeeignet.

Es wurden vorwiegend Zellen im Übergangs-, bzw. Spätstadium untersucht, in denen die X-chromosomale Heterozyklie wegen der schwächeren autosomalen Markierung deutlich zu erkennen ist. Ausgewertet wurden nur solche Metaphaseplatten, die eine eindeutige, dem X-Chromosom entsprechende Spätmarkierung in der C-Gruppe aufwiesen, und die als vollständig angesehen werden konnten. Eine Entfernung der Silberkörner und Kontrolle der Metaphaseplatten auf Vollständigkeit wurde wegen des umfangreichen Zellmaterials nicht vorgenommen.

44: MESSMETHODIK

Die Autoradiographien wurden erstmals mit dem CLASSIMAT (LEITZ), einem Gerät zur elektronischen Bildanalyse durch Fernsehmikroskopie ausgewertet.

44-1: GERÄTBESCHREIBUNG (KAMIN et al. 1970).

Der CLASSIMAT besteht aus einer

- optischen Einheit (Mikroskop)
- einem Fernseh-Analysesystem (Fernsehkamera und elektronische Aufbereitungs- und Analysezentrale)
- einer logischen Datenverknüpfungseinheit (z.B. DIEHL Combitron S.)
- und einem Monitor. (Abb. 3)

Mit diesem Gerät kann jedes Objekt ausgemessen werden, das auf der Empfängerfläche der Fernsehröhre abgebildet wird, und so präpariert ist, daß sich die zu unterscheidenden Anteile in ihren Grauwerten voneinander abheben. Die Bildhelligkeit wird konstant gehalten und der Empfindlichkeit der Fernsehröhre angepaßt.

Das aus 625 Zeilen bestehende Fernsehbild wird in zwei Halbbilder zerlegt, die nacheinander abgetastet werden. Die Abtastung eines Halbbildes dauert 1/50 Sekunde.

Das Bild wird von einer Schwarz-weiß-Fernsehkamera aufgenommen, der den Parameter "Farbe" entsprechend der spektralen Empfindlichkeit der Plumbicon Aufnahmeröhre und in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke als Grauwert wiedergibt.

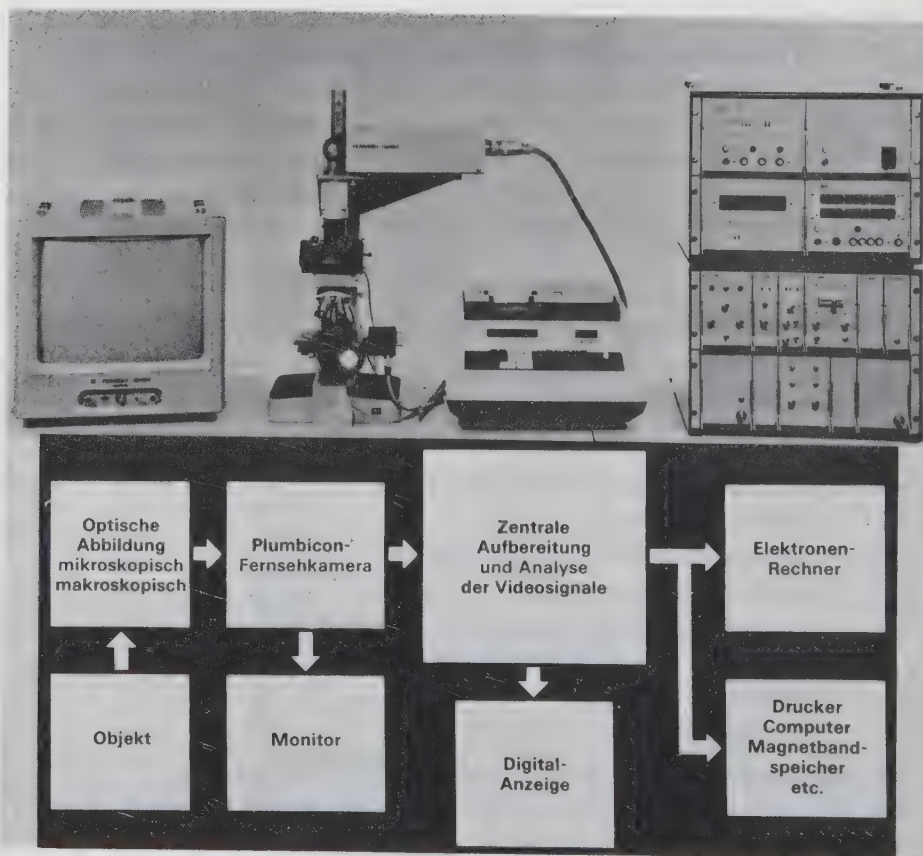


Abb. 3: CLASSIMAT (LEITZ 1969/70)

Die Plumbicon Aufnahmeröhre weist eine lineare Kennlinie auf, d. h. die Videosignalspannung ist eine lineare Funktion der Beleuchtungsstärke (Fig. 5)

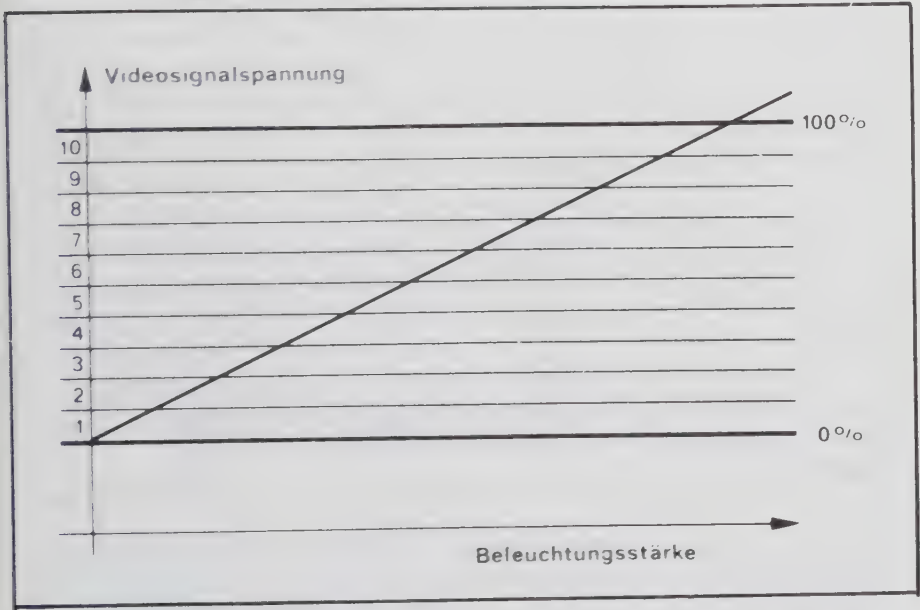


Fig. 5: Kennlinie der Plumbicon-Röhre. Lineare Unterteilung des Grauwertbereiches eines Bildes von "Schwarz" bis zum hellsten Bildpunkt in 10 Teilintervalle.

Gleichen Grauwertintervallen der Bildvorlage werden gleiche Signalintervalle zugeordnet. Daher ist eine lineare Unterteilung des Grauwertangebotes eines Bildes von Schwarz bis zum jeweils hellsten Bildpunkt in 10 Teilintervalle möglich, von denen jedes 10 % des gesamten Grauwertumfanges beinhaltet.

Von diesen 10 Intervallen können nun die Einzelintervalle oder zusammenhängende Intervallgruppen beliebigen Niveaus separiert werden, wobei eine kontinuierliche Verschiebung innerhalb der Grauskala möglich ist. Damit können alle Strukturen der Bildvorlage, welche die gleichen Grauwerte besitzen, zur Messung ausgewählt werden. - Die Fernsehaufnahmeröhre wird so geeicht, daß der dunkelste mögliche Grauwert, der fehlendem Licht entspricht, an den Anfang der Kennlinie gelegt wird. Dann wird die Beleuchtung des Objektes so geregelt, daß für den hellsten Bildpunkt die Videosignalspannung einen fest vorgegebenen Wert im oberen Bereich der Kennlinie hat. Bei richtiger Beleuchtungsstärke entspricht also der Grauwertbereich für jedes beliebige Objekt immer dem gleichen Spannungsintervall und ist hiermit eindeutig reproduzierbar definiert. Der Monitor dient als Kontrollgerät, auf dem das zur Messung ausgewählte Objekt abgebildet wird. Um die Bildteile, die gemessen werden sollen, kenntlich zu machen, können in das Monitorbild Kennungssignale eingeblendet werden, die dem ausgewählten Grauwertbereich entsprechen. Dadurch heben sich die erfaßten Bildteile hell von der Umgebung ab.

Zur Messung läßt sich das gesamte Bildfeld benutzen. Man kann das Meßfeld aber auch durch Einblenden einer elektronischen Maske begrenzen. Die Höhe und Breite der Maske, sowie ihre Lage im Bildfeld lassen sich beliebig verändern.

44-2: MESSPRINZIP

Das Meßprinzip des CLASSIMAT beruht auf einem Punktzählverfahren. Alle Zeilen der beiden Monitorhalbbilder werden durch einen 10 Mhz-Oszillator in einzelne Punkte zerlegt. Dadurch entsteht ein sehr enges Raster, von dem nur solche Punkte gezählt werden, die als "Treffer" auf die nach Grauwerten ausgewählten Bildstrukturen fallen. (Fig. 6). Der Zähler summiert alle an ihn durchgegebenen Impulse auf, deren Gesamtzahl der Größe der erfaßten Fläche proportional ist.

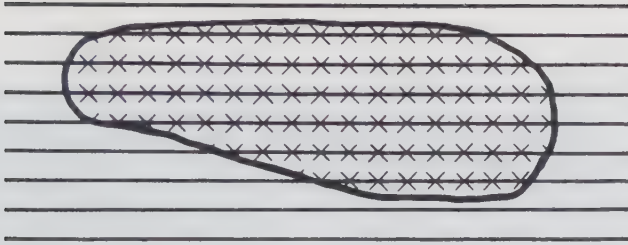


Fig. 6: CLASSIMAT, Meßprinzip: Flächenmessung durch integrierende Rasterpunktzählung

Der Zählerinhalt repräsentiert also den relativen Flächenanteil einer Komponente. Nach Umrechnung mit einem Eichfaktor kann der absolute Flächeninhalt angegeben werden. Mithilfe feststehender Programme kann neben der Flächenmessung auch eine Durchmesserbestimmung, sowie eine Partikelzählung ausgewählter Strukturen vorgenommen werden. Alle gemessenen, d. h. gezählten Grundgrößen werden in ursprünglicher Form als Zahl digital dargestellt. Weitere Datenverknüpfungen sind über den Rechner möglich.

44-3: DURCHFÜHRUNG DER MESSUNGEN

Zur Auswertung der Chromosomenautoradiographien werden die Silberkörner auf dem Monitor scharf eingestellt (Abb. 4a), anschließend der hellste Bildwert am Pegelmeßgerät kontrolliert. Dann wird mit Hilfe des Kennungssignals aus der Grauskala der Bereich ausgewählt, der möglichst genau der Schwärzung der Silberkörner entspricht (Abb. 4b). Dabei muß in Kauf genommen werden, daß einzelne Körner aus tieferen Präparatschichten, die heller erscheinen als Körner in der Mikroskopierebene nicht erfaßt werden, obwohl sie visuell gezählt werden können. Andererseits löst sich das bei visueller Zählung oft störende Problem der Background-Silberkörner hier von selbst. Sie werden bei der SchwellenwertEinstellung nicht mit erfaßt, da sie ebenfalls heller erscheinen als Körner, die auf Chromatiden liegen.

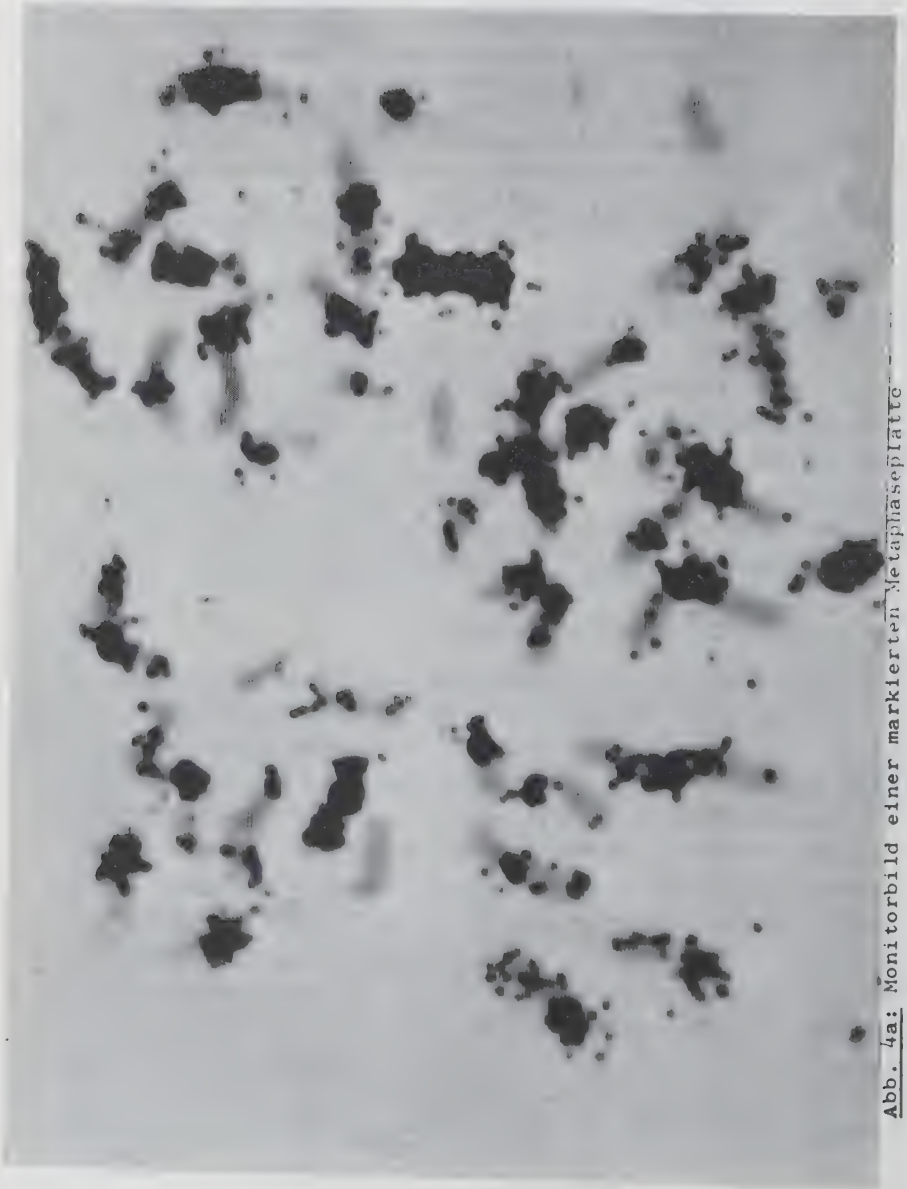


Abb. 4a: Monitorbild einer markierten Metaphaseplatte

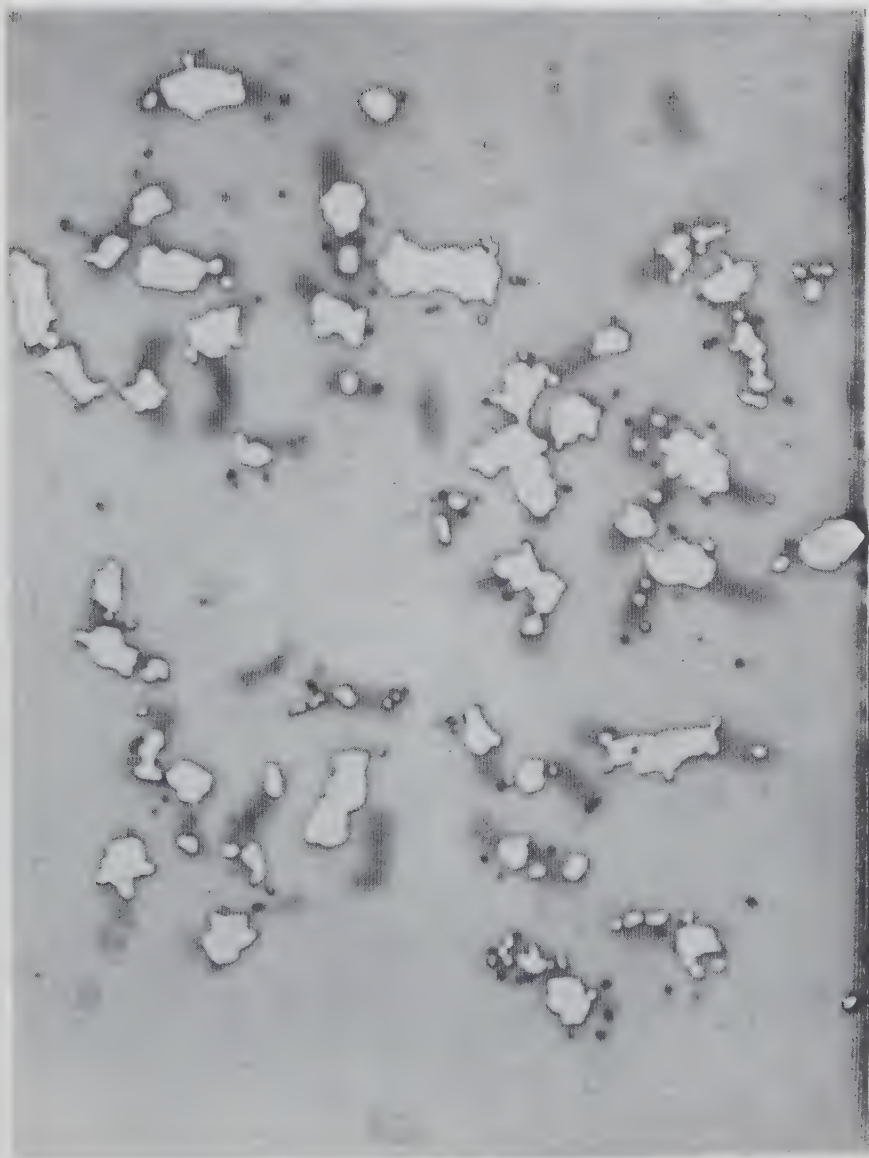


Abb. 4b: Monitorbild mit Kennungssignal

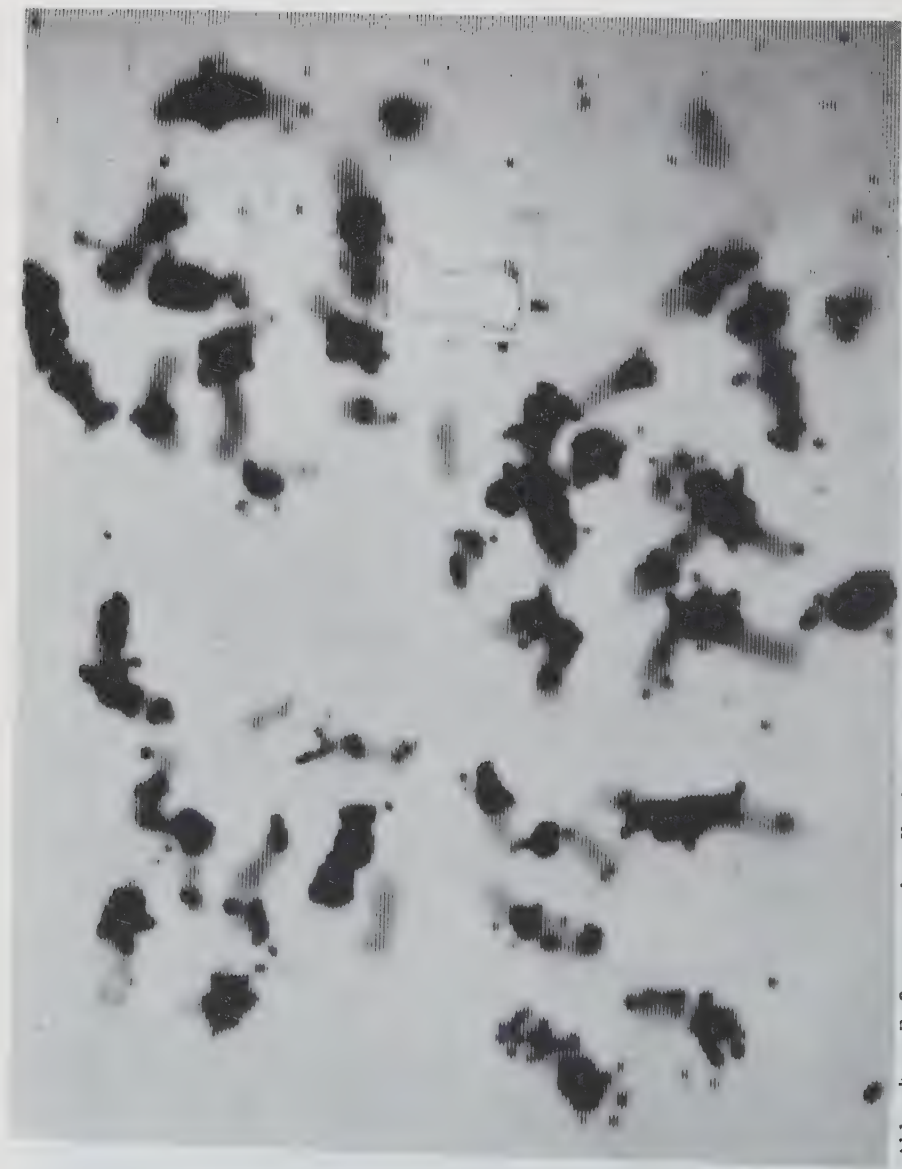


Abb. 4c: Erfassung der X-chromosomalen Markierung mit
Hilfe von Maske und Kennungssignal (Monitorbild)

Der Kontrast zwischen Silberkörnern und Chromosomen ist ausreichend groß, sodaß eine genaue Einstellung der Silberkörner ohne Chromosomenanteile möglich ist. Metaphasefiguren mit Chromosomenüberkreuzungen müssen jedoch wegen der dadurch entstehenden stärkeren Schwärzung, die in den Bereich der Silberkörner kommt, ausgeschieden werden.

Artefakte mit gleicher Schwärzung wie Silberkörner werden vor der Messung ausgeblendet, gemessen und vom eigentlichen Meßwert subtrahiert.

Da Chromosomenautoradiographien überwiegend nahe zusammenliegende, bzw. teilweise konfluierende Silberkornareale enthalten, verzichten wir auf eine Bestimmung der Silberkornzahl. Wir messen vielmehr die Fläche der über den Chromosomen liegenden Silberkörner als Maß für die Markierungsintensitäten. Mehrfach übereinander liegende Silberkörner können jedoch hierbei ebensowenig wie bei der Silberkornzählung quantitativ erfaßt werden.

Nach subjektiver Einstellung der optimalen Kennung wird die Fläche der Markierung über der ganzen Metaphaseplatte mithilfe der Maske begrenzt und gemessen. Anschließend wird die Maske verkleinert, über das X-Chromosom geschoben und bei unveränderter Einstellung wiederum gemessen (Abb. 4c).

Wir lassen uns vom Rechner den Wert der X-chromosomalen, sowie der autosomalen Markierung und den Quotienten aus beiden Größen ausdrucken, welcher die X-chromosomale Heterozyklie darstellt. Als Bezugssystem dient die CLASSIMAT-Einheit "Rasterpunkte". Auf Umrechnung in ein metrisches System wurde verzichtet.

44-4: NEBENGENAUIGKEIT

44-41: G e r ä t f e h l e r

Um den geräteigenen Fehler des CLASSIMAT festzustellen, wurden an 5 Zellen bei konstanter Einstellung automatisch je 10

X				2n		
	$\bar{x}$	s	v	$\bar{x}$	s	v
1 ●	707,30	36,55	0,05	5753,78	522,71	0,09
0	700,20	8,40	0,01	5839,10	46,63	0,01
+	34,00	1,87	0,06	475,80	15,96	0,03
2 ●	706,10	18,89	0,03	4062,67	315,34	0,08
0	694,50	8,64	0,01	3905,70	18,04	0,01
+	43,20	3,96	0,09	326,20	17,77	0,05
3 ●	602,20	28,64	0,05	8177,10	647,30	0,08
0	613,90	12,87	0,02	8499,10	57,29	0,01
+	34,80	2,95	0,09	619,80	33,28	0,05
4 ●	553,80	15,02	0,03	4178,10	477,86	0,11
0	543,18	6,39	0,01	3888,40	32,68	0,01
+	38,40	1,34	0,04	329,40	11,50	0,04
5 ●	790,60	35,58	0,05	9004,89	924,50	0,10
0	782,30	5,81	0,01	8650,90	26,49	0,003
+	45,00	4,18	0,09	699,60	24,03	0,04

Tab. 2: Genauigkeit der CLASSIMAT-Messung für die X-chromosomale Markierung (X), bzw. die Markierung einer ganzen Metaphaseplatte (2n).

$\bar{x}$: Mittelwert; s: Standardabweichung;

v: Variationskoeffizient

● Bestimmung des subjektiven Einstellungsfehlers
(10 Messungen, jeweils neu eingestellt)

0 Bestimmung des Gerätefehlers
(10 Messungen, unveränderte Einstellung)

+

Konventionelle Körnerzählung;
(5 Zählungen)

Messungen nacheinander durchgeführt, und daraus Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (s) und Variationskoeffizient (v) errechnet (Tab. 2). Die Gerätschwankung ist für das X-Chromosom allein (X), sowie für die ganze Metaphaseplatte (2n) annähernd konstant und mit 1-2 % sehr gering, sodaß sie vernachlässigt werden kann.

44-42: Reproduzierbarkeit der apparativen Flächenmessung

Um zu prüfen, inwieweit die subjektive Einstellung der optimalen Kennung die Reproduzierbarkeit der Messungen beeinflusst, wurden an jeder der 5 Zellen 10 unabhängige Messungen durchgeführt, wobei die Einstellung des Schwellenwertes jedesmal neu erfolgte. Die Meßwerte schwanken für die X-chromosomale Markierung, die sich fast immer als zusammenhängende Fläche darstellt bis zu 5 %, für die aus vielen kleinen Flächen zusammengesetzte Markierung einer ganzen Metaphaseplatte beträgt der prozentuale Anteil der Standardabweichung am Mittelwert durchschnittlich 9,2 %.

Diese Schwankung kann verringert werden, wenn die Messungen in einem vorgewählten, möglichst engen Grauwertbereich durchgeführt werden. Es ist jedoch nicht möglich, einen bestimmten Schwellenwert für die Messung der Silberkörner im Bild festzulegen, obwohl anzunehmen ist, daß der Grauwert des metallischen Silbers im Präparat konstant ist. Offensichtlich verändern nicht standardisierbare Faktoren, wie z. B. Dicke und Anfärbbarkeit der Chromosomen die Helligkeit der Silberkörner so stark, daß bei konstanter Schwelleneinstellung Fehlmessungen auftreten, bzw. viele Zellen überhaupt nicht vermessen werden können. Wir haben uns daher zu einer freien Wahl des Schwellenwertes nach subjektiv optimalen Kriterien entschlossen.

44-43: Reproduzierbarkeit der visuellen Körnerzählung

Bei Prüfung der Reproduzierbarkeit visueller Silberkornzählungen ergibt sich für die X-chromosomale Markierung nach 5 maliger Zählung eine erheblich größere Schwankung (4 - 9 %) als für die apparative Flächenmessung (3 - 5 %). Für die gesamte Metaphaseplatte ist die Körnerzählung genauer (3 - 5 %) als die Messung (8 - 11 %).

Für größere quantitative Untersuchungen ist die visuelle Körnerzählung jedoch praktisch nicht anwendbar, da sie einen zu großen Zeitaufwand erfordert, und mit dem schlecht kontrollierbaren Fehler, der sich durch Ermüdung einstellt, belastet ist.

45: CHARAKTERISIERUNG DES MESSPRINZIPS

Um das Verhältnis zwischen Flächenmessung und visueller Körnerzählung näher zu charakterisieren, ermittelten wir für kleine, gut zählbare Silberkornareale (bis maximal 30 Körner) die Zahl und die zugehörigen Flächenwerte. Wir wollten insbesondere wissen, ob prinzipiell ein linearer Zusammenhang zwischen Fläche und Zahl besteht, oder ob etwa bei höherer Markierung die Flächenwerte gegenüber der Zahl abnehmen.

Die Ergebnisse (Fig. 7) zeigen eine starke Streuung der einzelnen Flächenwerte bei der Zuordnung zur Körnerzahl. Berechneten wir jedoch aus einer größeren Anzahl ($n = 300$) solcher Messungen die mittlere Fläche für die einzelnen Körnerzahlen (Fig. 8), so zeigte sich eine gute lineare Abhängigkeit dieser Mittelwerte zur Körnerzahl ($r = 0,9789$), d. h. bei sehr vielen Messungen innerhalb eines Markierungsgrades kann durch Mittelwertbildung ein der Genauigkeit idealer Silberkornzählung entsprechender Wert gefunden werden, wobei jedoch berücksichtigt werden muß, daß mit steigender Markierung eine ideale Zählung nicht mehr möglich ist.

*Zusammenhang zwischen Silberkornzählung
und apparativer Flächenmessung*

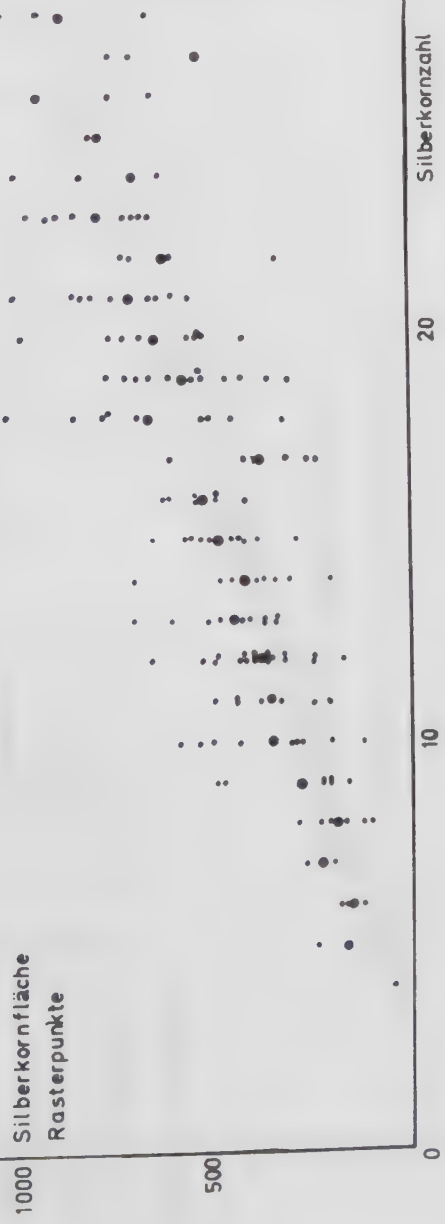
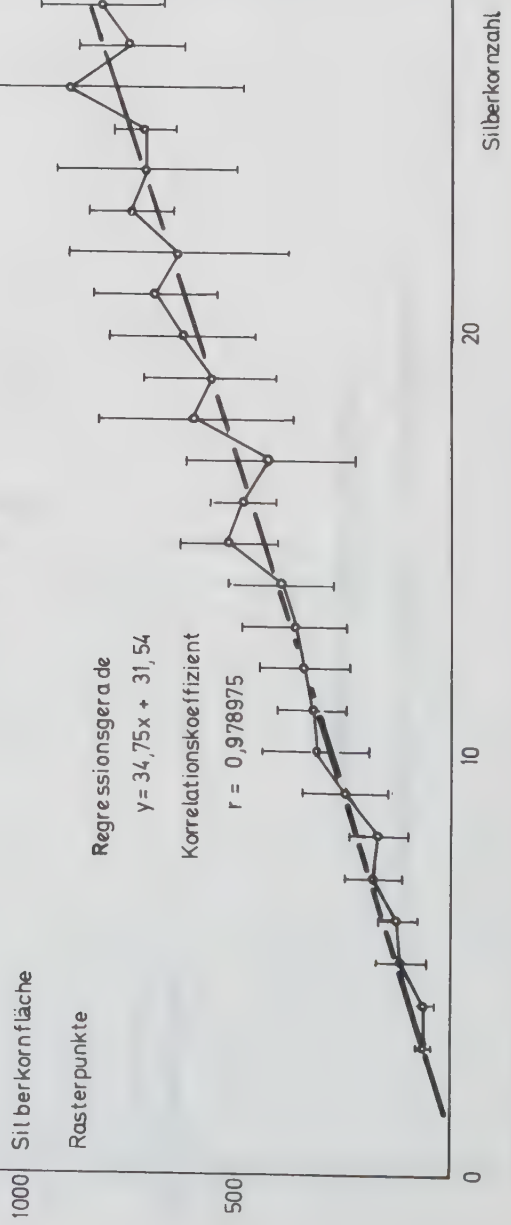


Fig. 7

Zusammenhang zwischen Silberkornzählung und apparativer Flächenmessung



Abhängigkeit der Silberkornfläche (y) von der Zahl (x)
in 10 Stichproben (I-X)

	r	a	b
I.	0,90	28,30	-25,30
II.	0,90	27,84	0,64
III.	0,91	36,16	-68,65
IV.	0,94	32,12	-50,54
V.	0,86	25,93	+50,08
VI.	0,94	37,43	-78,64
VII.	0,85	34,91	-24,20
VIII.	0,89	36,30	-78,47
IX.	0,84	38,26	-100,78
X.	0,91	36,70	-85,89

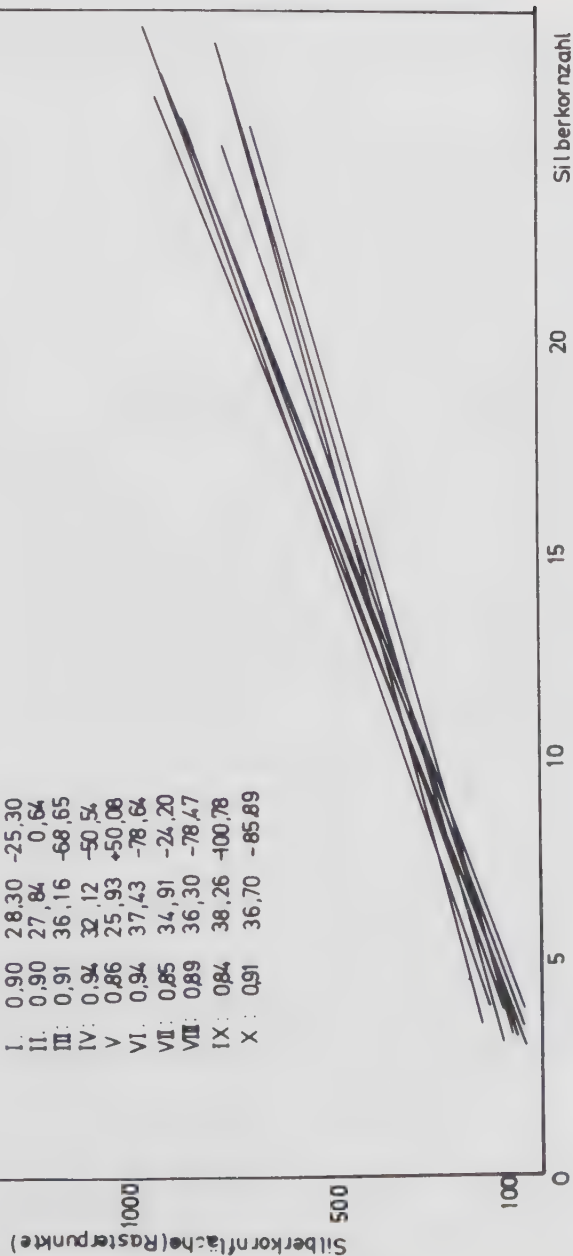


Fig. 9

Um den Einfluß der Streuung der einzelnen Flächenwerte auf den Verlauf der Regressionsgerade zu prüfen, bildeten wir 10 Stichproben, in denen jeder Silberkornzahl zwischen 1 und 30 ein dazugehöriger Flächenwert zugeordnet wurde (Fig. 9). Die abgebildeten 10 Regressionsgeraden sind also aus je 30 Wertepaaren errechnet, wobei y die Fläche, x die Zahl repräsentiert. Alle 10 Geraden zeigen eine relativ gute lineare Abhängigkeit der beiden Größen mit einem mittleren Koeffizienten von $r = 0,89$.

46: ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die einzelne Flächenmessung zwar ein relativ ungenaues Maß für die Silberkornzahl ist, daß Mittelwertbildungen aus einer größeren Anzahl von Flächen jedoch eine gute lineare Abhängigkeit zur Silberkornzahl haben. Damit erweist sich dieses Meßprinzip für die vorliegende Fragestellung als geeignet, da zur Bestimmung des Heterozyklieverhaltens eine große Anzahl von Zellen aus dem weiten Spektrum der späten DNS-Synthesphase ausgewertet werden muß, die in Markierungsgraden zusammengefaßt als Mittelwerte weiter verarbeitet werden können.

5: ERGEBNISSE

51: VERGLEICH DER X-CHROMOSOMALEN UND AUTOSOMALEN MARKIERUNG EINZELNER ZELLEN BEI 15 WEIBLICHEN INDIVIDUEN

Zunächst wurden die mit dem CLASSIMAT ermittelten Meßwerte für die Markierung über den Autosomen ($2n-X$) und dem heterozyklischen X-Chromosom jeder Zelle in ein Koordinatensystem übertragen und die daraus resultierenden Punktwolken miteinander verglichen (Fig. 10 A-P).

Trotz erheblicher Streuung läßt sich eine unterschiedliche Form und Lage dieser Punktwolken erkennen. So wurden bei dem 8 Monate alten Kind (A), sowie bei der 54 (M) und 58 (P) jährigen Probandin relativ niedrige Werte für die X-chromosomale Markierung gemessen, die bei abnehmender autosomaler Markierung ähnlich einer Geraden gegen 0 zu laufen. Davon unterscheiden sich deutlich die Punktwolken der jüngeren Frauen zwischen 20 und 26 Jahren, bei denen vergleichsweise höhere Werte für die X-chromosomale Markierung gefunden wurden. Besonders auffallend ist bei den jungen Frauen im Alter von 20, 23 und 26 Jahren (E,G,K) die hohe X-chromosomale Syntheseaktivität bei niedriger autosomaler Markierung, die zu einem kurvenförmigen Verlauf der Punktwolken mit einem steilen terminalen Abfall zum Punkt 0 hin führt. Lediglich die 22 jährige Probandin (F) läßt diese hohe terminale X-Markierung vermissen. - Eine insgesamt hohe X-chromosomale Syntheseaktivität weisen auch die 50, 55 und 56 jährige Probandin (L,N,O) auf, wobei der Abfall gegen 0 sich weniger steil darstellt. Die 9 und 12 Monate alten Kinder (B,C) zeigen wiederum vergleichsweise niedrige Werte für die X-chromosomale Markierung ohne den auffallend steilen Abfall gegen 0.

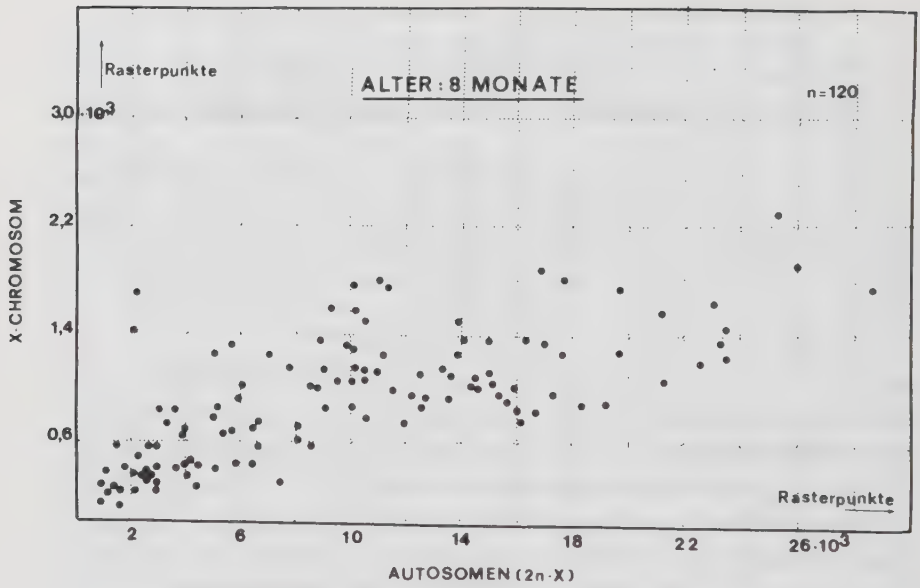


Fig. 10 A

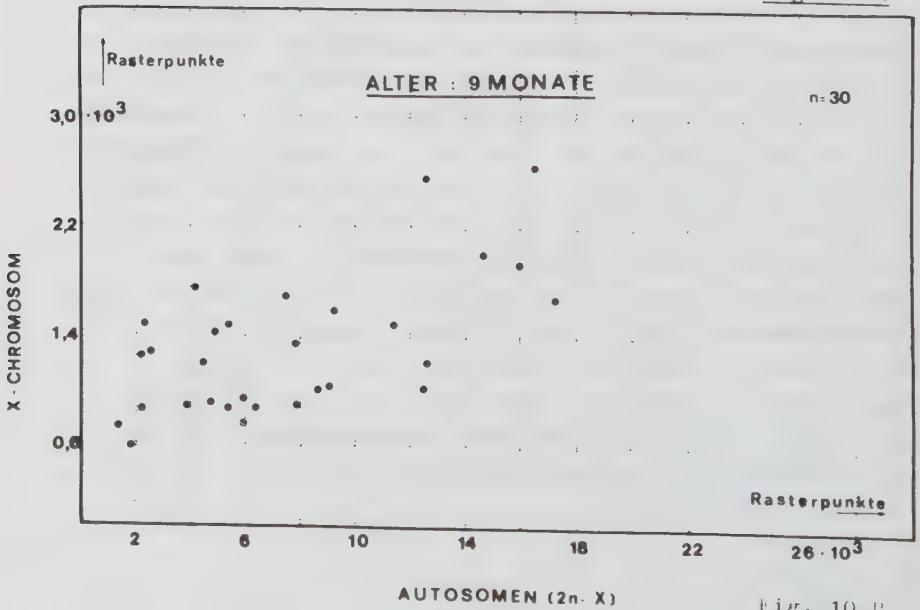


Fig. 10 B

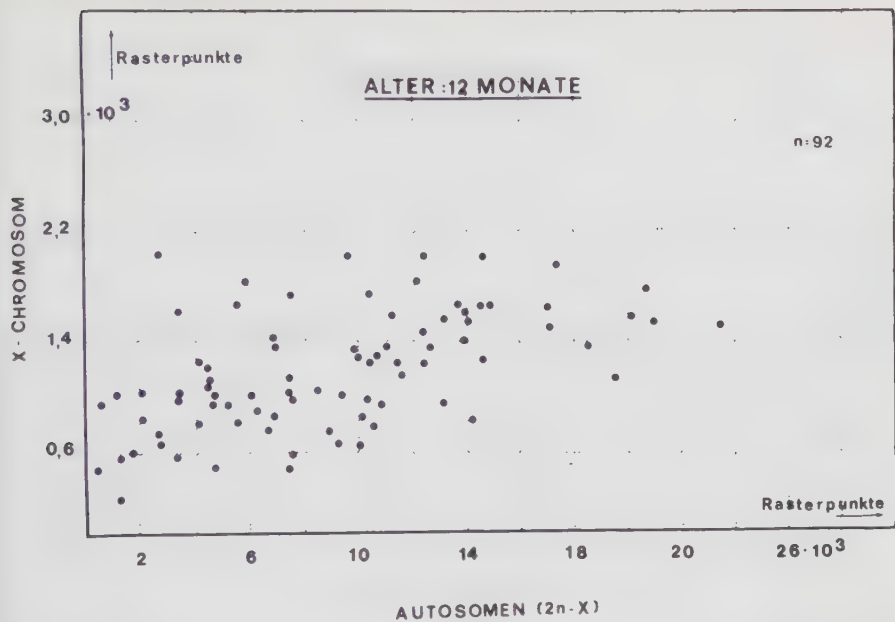


Fig. 10 C

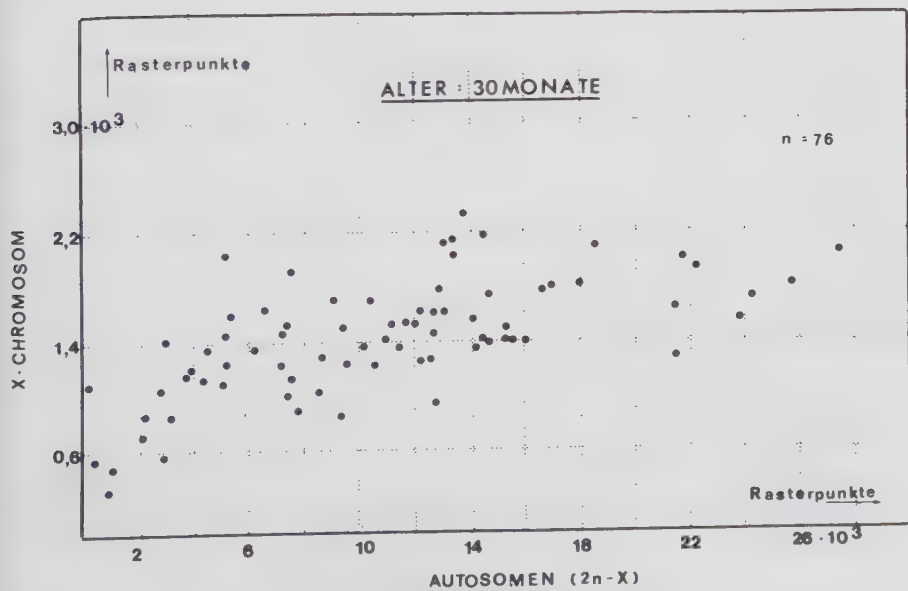


Fig. 10 D

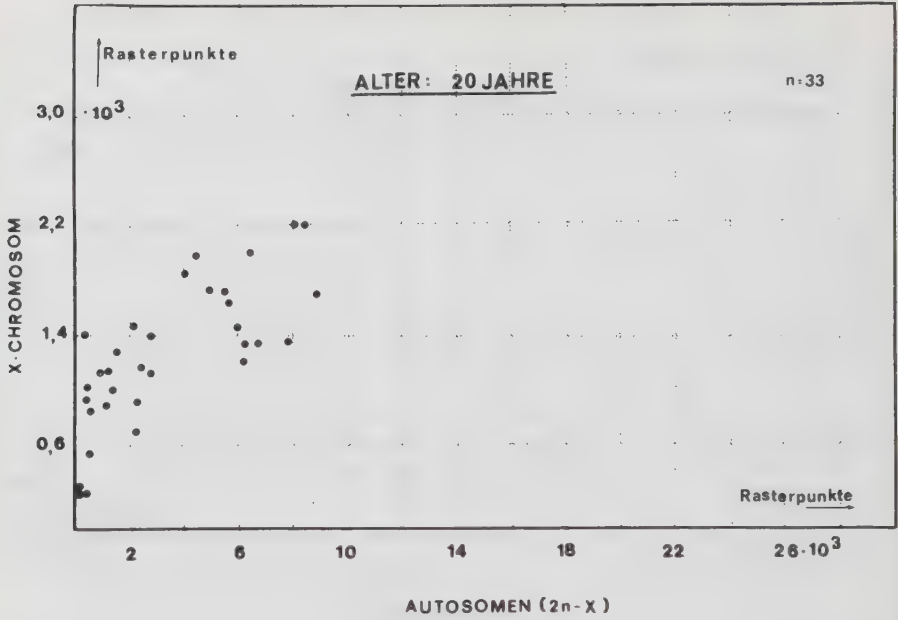


Fig. 10 E

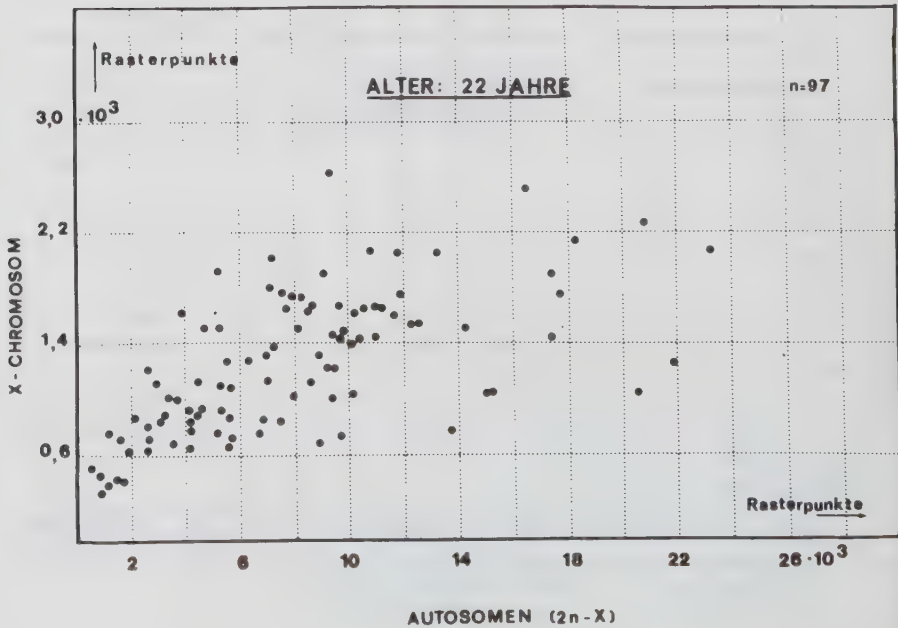


Fig. 10 F

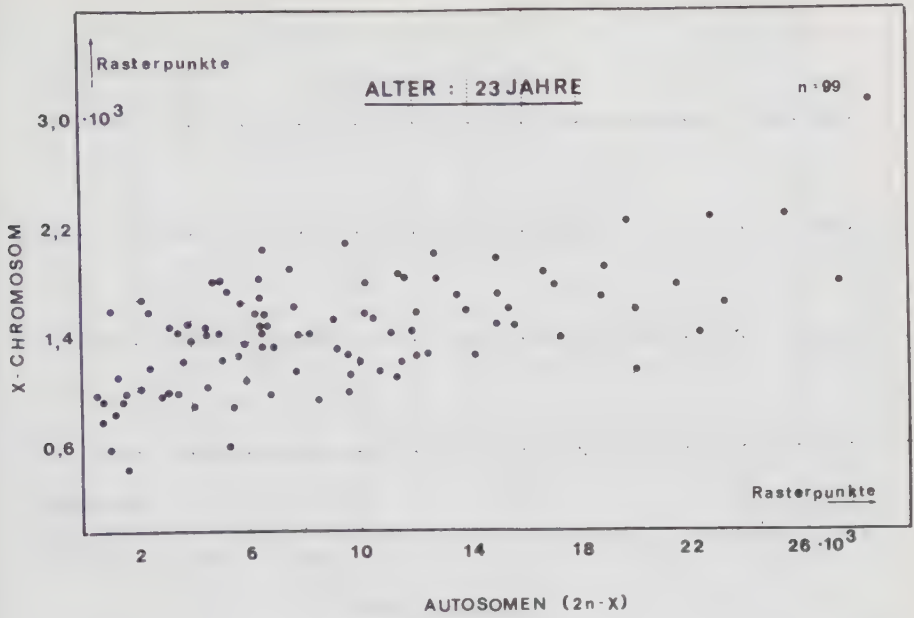


Fig. 10 G

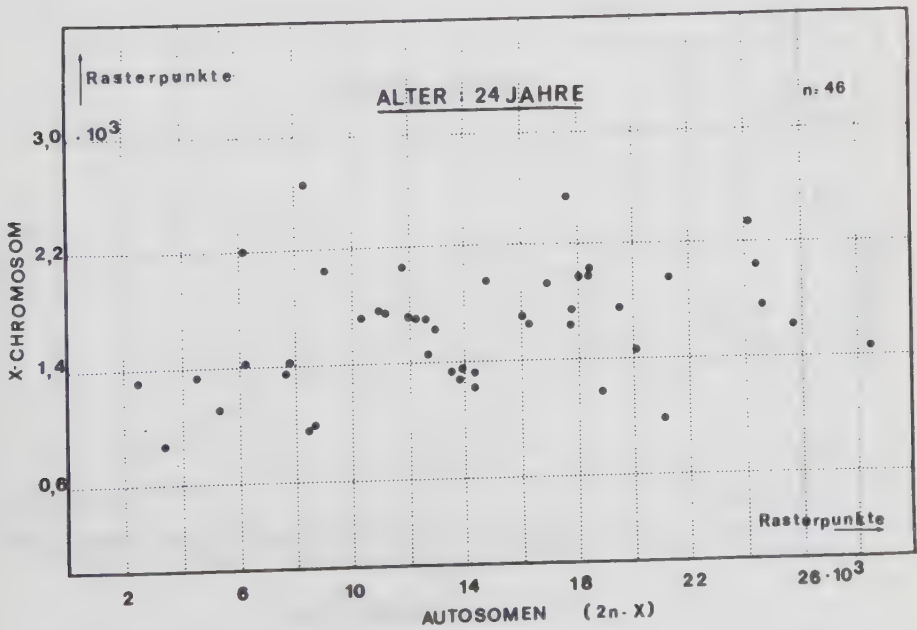


Fig. 10 H

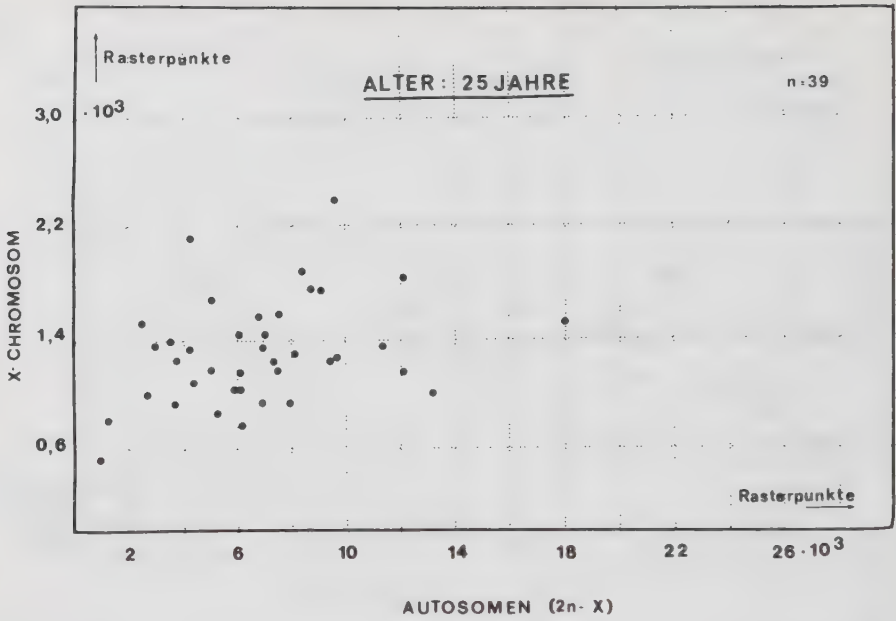


Fig. 10 I

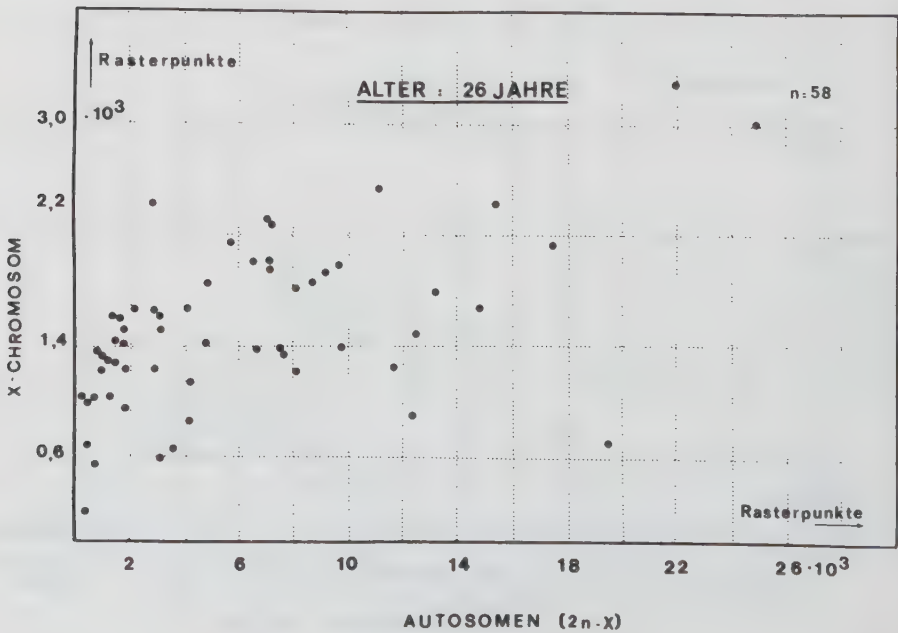


Fig. 10 K

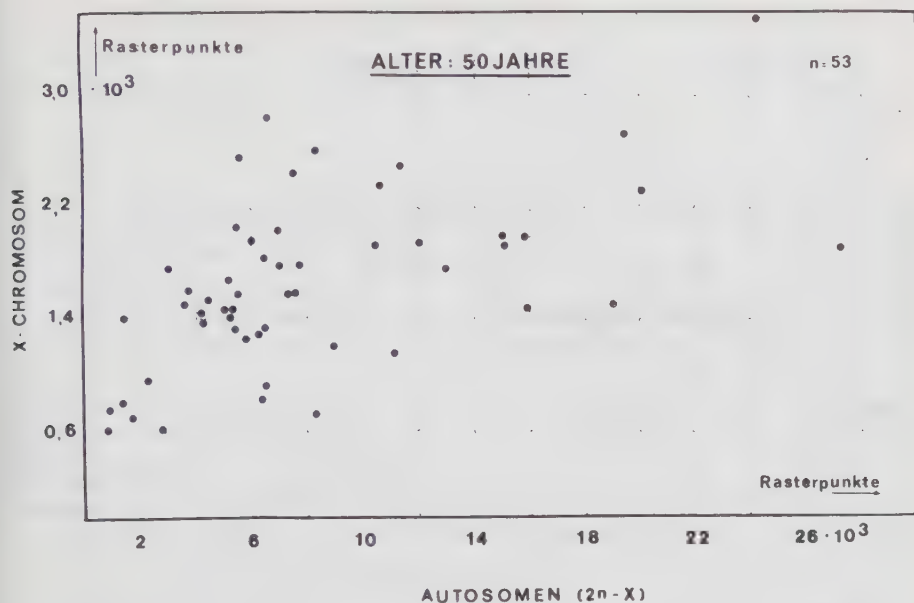


Fig. 10 L

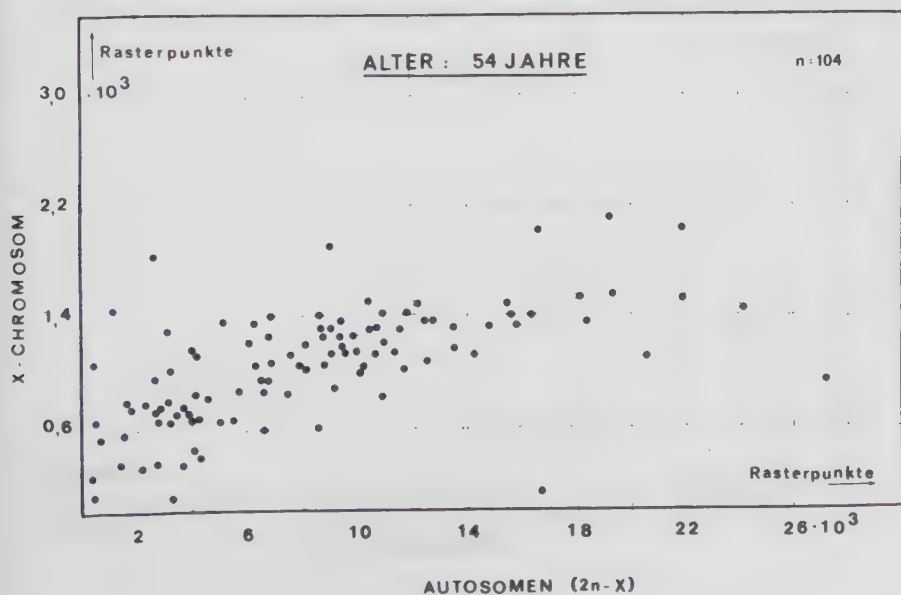


Fig. 10 M

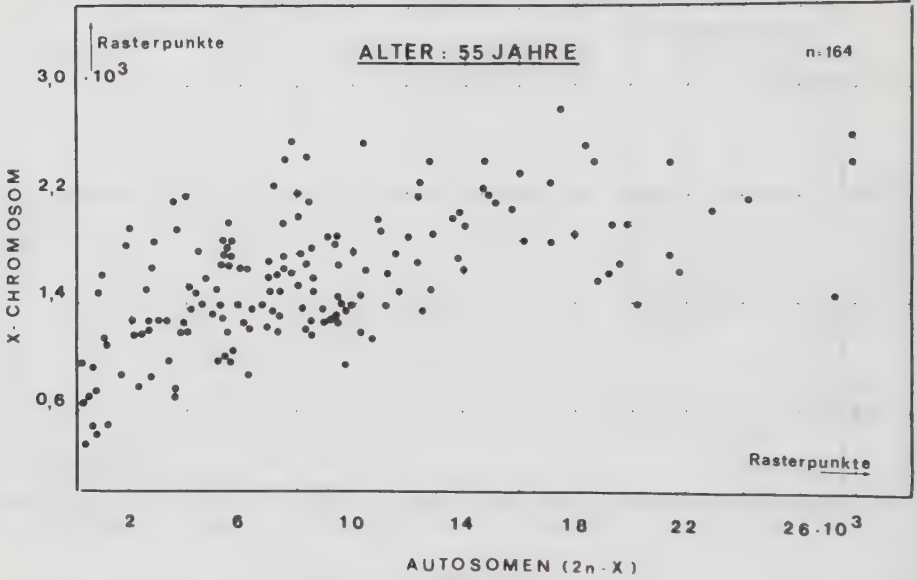


Fig. 10 A

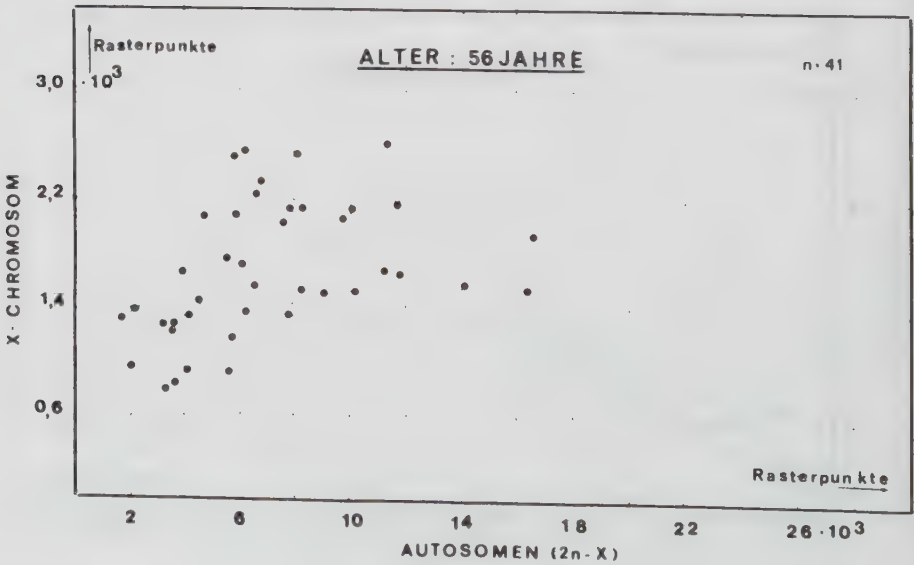


Fig. 10 O

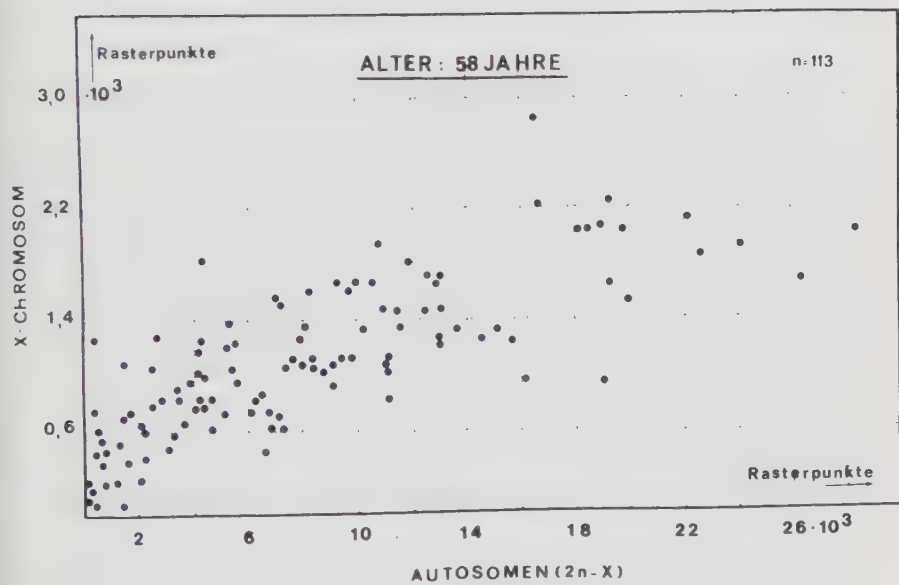


Fig. 10 P

Um das X-chromosomale Heterozyklieverhalten der 15 untersuchten Individuen rechnerisch vergleichen zu können, wurde die Abszisse durch Zusammenfassung der Meßwerte für die autosomale Markierung bei einer willkürlich gewählten Schrittweite von 2000 Rasterpunkten in 13 Markierungsgrade unterteilt.

52: HOMOGENITÄTSPRÜFUNG FÜR DIE X-CHROMOSOMALE
HETEROZYKLIE ALLER INDIVIDUEN

Mit dem H-test von KRUSKAL und WALLIS (entnommen aus L. SACHS, 1969) wurde geprüft, ob die Werte für die X-chromosomale Markierung aller untersuchten Individuen innerhalb der ersten 5 Markierungsgrade einer gemeinsamen Grundgesamtheit entstammen oder nicht. Dabei blieben in den einzelnen Markierungsgraden solche Individuen unberücksichtigt, die weniger als 5 Meßwerte aufwiesen.

Markierungsgrad		1	2	3	4	5
	n	105	144	163	156	120
	k	9	14	14	13	11
INDIVIDUUM	H	36,92	53,18	73,77	74,42	33,66
A-P	0,1%	26,13	34,53	34,53	32,91	29,59
	χ^2 1,0%	20,09	27,69	27,69	26,22	22,21
	5,0%	15,51	22,36	22,36	21,03	18,31

Tab. 3: H-Test nach KRUSKAL und WALLIS

n = Anzahl der Werte aller Stichproben; k = Anzahl der Stichproben; $\hat{\Pi}$ = Prüfgröße; $\chi^2 = 0,1\%$, 1% und 5% - Schranken der χ^2 - Verteilung;

$\hat{\Pi} > \chi^2$: Die Werte widersprechen der Annahme einer gemeinsamen Grundgesamtheit

Nach Berechnung der Prüfgröße $\hat{H}$ ergab sich, daß die k Stichproben so gut wie sicher nicht einer gemeinsamen Grundgesamtheit entstammen: Zwischen der Lage der Werte für die X-chromosomale Markierung der einzelnen Individuen bestehen in den Markierungsgraden 1 - 5 noch auf dem 0,1 % - Niveau signifikante Unterschiede (Tab. 3a).

53: ZUSAMMENFASSUNG IN 3 ALTERSGRUPPEN

Aufgrund der beschriebenen Punktwolkendiagramme lag es nahe, zu prüfen, ob sich ein altersabhängiger Unterschied im X-chromosomalen Heterozyklieverhalten nachweisen läßt. Daher wurde eine Unterteilung des Probandenmaterials in 3 Altersgruppen vorgenommen:

Altersgruppe 1: 8 - 30 Monate, 4 Individuen

Altersgruppe 2: 20 - 26 Jahre, 6 Individuen

Altersgruppe 3: 50 - 58 Jahre, 5 Individuen

53-1: MITTLERE X-CHROMOSOMALE MARKIERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM MARKIERUNGSGRAD DER AUTOSOMEN

Fig. 11 a - c veranschaulicht die mittlere X-chromosomale Markierung der einzelnen Individuen innerhalb einer Altersgruppe für die Markierungsgrade 1 - 13. Die Standardabweichung gibt die Lage und Streuung der diesen Diagrammen zugrundeliegenden Punktwolken an. Der durchschnittliche Anteil der Standardabweichung an den Mittelwerten ist durch den mittleren Variationskoeffizienten ($\bar{v}$) ausgedrückt. Die 6 Individuen der Altersgruppe 2 (Fig. 11 b) zeigen bei etwa gleicher Streubreite insgesamt durchschnittlich höhere Werte für die X-chromosomale Markierung als die 4 Individuen der Altersgruppe 1 (Fig. 11 a). Die Altersgruppe 3 stellt, wie aus den Punktwolkendiagrammen bereits hervorging, keine einheitliche Gruppe dar: 2 Individuen, die 54 und 58 jährige Probandin haben in allen Markierungsgraden niedrige X-Werte ähnlich den Kindern, während die übrigen 3 Probandinnen der Gruppe im Alter von 50, 55 und 56 Jahren hohe Werte entsprechend der Gruppe der jüngeren Frauen aufweisen.

Mittlere X chromosomale Markierung in Abhängigkeit vom Markierungsgrad der Autosomen ($2n-X$)

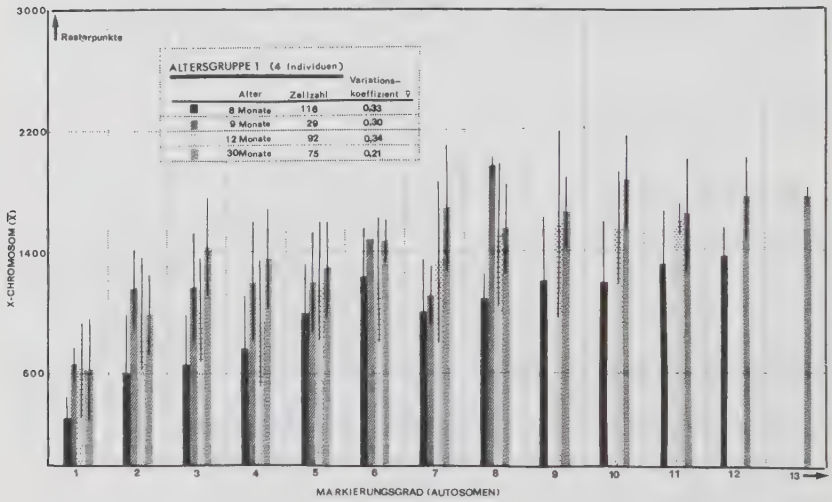


Fig. 11 a

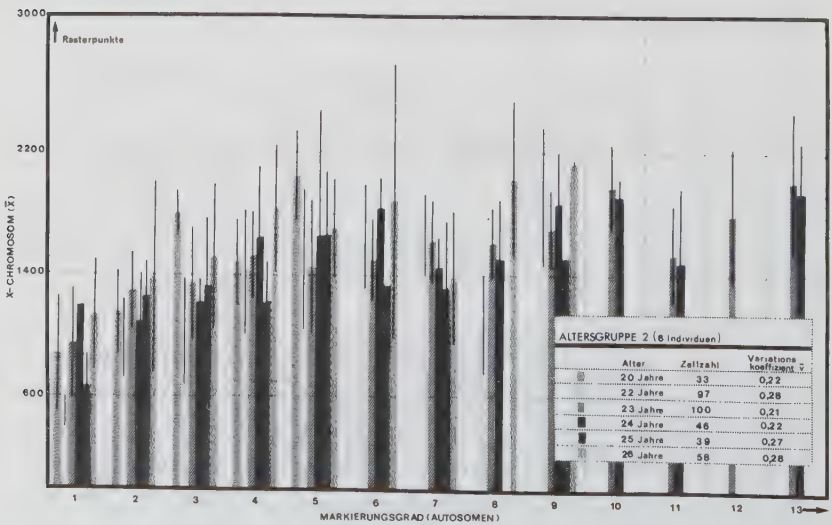


Fig. 11 b

Mittlere X chromosomale Markierung in Abhängigkeit vom Markierungsgrad der Autosomen ($2n-X$)

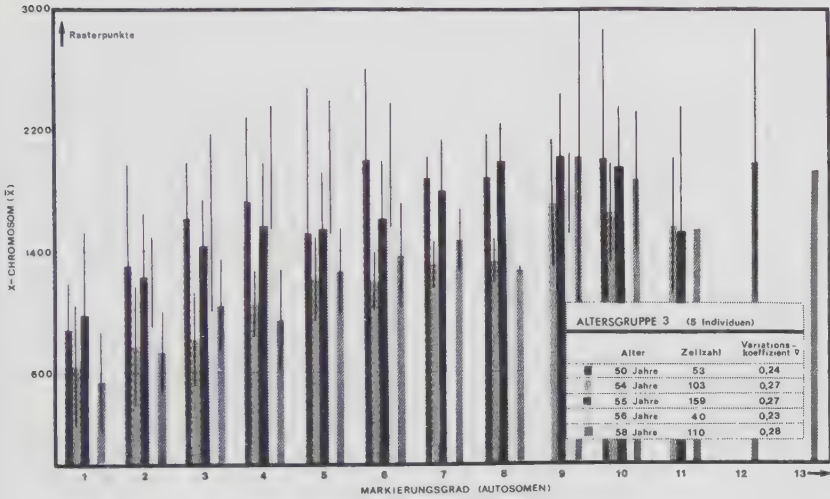


Fig. 11 c

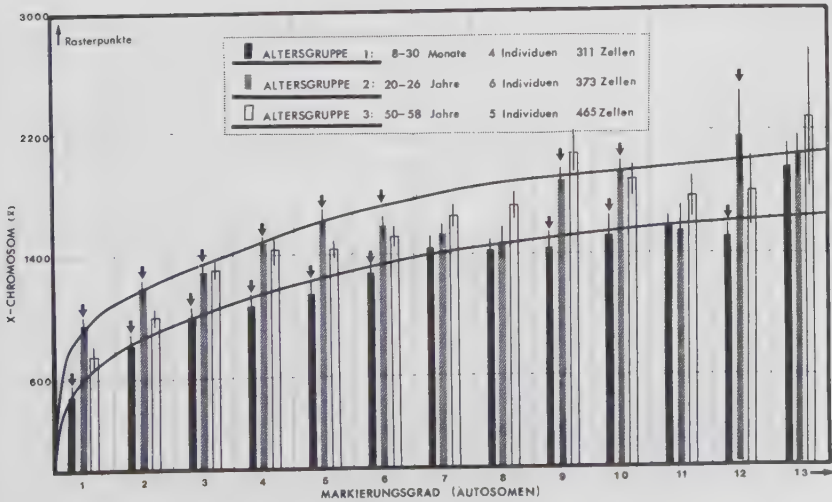


Fig. 11 d

Eine Zusammenfassung der Werte für die X-chromosomale Markierung innerhalb der 3 Altersgruppen ist in Fig. 11 d wiedergegeben. Die eingezeichneten Abweichungen entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte für die X-chromosomale Markierung. Ein Vergleich der Mittelwerte der Altersgruppen 1 und 2 mit dem t - Test nach STUDENT, und dem parameterfreien U - Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY (entnommen aus L. SACHS 1969) ergab hochsignifikante Unterschiede in den meisten Markierungsgraden; sie sind in Fig. 11 d mit Pfeilen bezeichnet. Die Anzahl der Werte in beiden Altersgruppen (n), sowie die Höhe der Irrtumswahrscheinlichkeiten (a) sind in Tab. 4 wiedergegeben.

Markierungs- grad	n (AG1)	n (AG2)	a(t-Test)	a(U-Test)
1	18	49	$< 0,0001 \%$	$< 0,0001 \%$
2	39	44	$< 0,0001 \%$	$< 0,0001 \%$
3	41	51	$< 0,002 \%$	$< 0,005 \%$
4	35	57	$< 0,0001 \%$	$< 0,0001 \%$
5	28	43	$< 0,0001 \%$	$< 0,0001 \%$
6	41	29	$< 0,001 \%$	$< 0,001 \%$
7	36	24	$< 0,5 \%$	$< 0,3 \%$
8	25	16	$\emptyset$	$\emptyset$
9	18	15	$< 0,01 \%$	$= 0,01 \%$
10	11	9	$< 0,02 \%$	$< 0,05 \%$
11	9	8	$\emptyset$	$\emptyset$
12	7	5	$< 0,01 \%$	$< 0,01 \%$
13	3	14	$\emptyset$	$\emptyset$

Tab. 4: Signifikanzberechnung für die Unterschiede der X-chromosomalen Markierung zwischen Altersgruppe 1 und 2
n = Anzahl der Werte für die X-chromosomale Markierung innerhalb der Altersgruppen 1 und 2
a = Irrtumswahrscheinlichkeit

53-2: LINEARE REGRESSION

Zur Darstellung und zum Vergleich der X-chromosomalen Heterozyklie wurde auch die lineare Regression berechnet, obwohl die Punktwolken einzelner Individuen keine lineare Abhängigkeit vermuten ließen. Dabei wurden die Markierungsgrade 1 - 13 als unabhängige Variable x , die mittlere X-chromosomale Markierung jedes Individuums als abhängige Variable y angesehen (Fig. 12 a - c).

53-21: Korrelationskoeffizient r

Die Korrelationskoeffizienten der 15 untersuchten Individuen zeigen insgesamt einen nur schwachen Zusammenhang zwischen den Variablen x und y an. Der Vergleich der Korrelationskoeffizienten läßt jedoch wiederum eine Charakterisierung des Heterozyklieverhaltens der einzelnen Individuen zu: Eine relativ gute lineare Abhängigkeit (r : 0,96 - 0,93) weisen die 3 jüngeren Kinder (8, 9, 12 Monate) auf.

Die für die Altersgruppe 2 errechneten durchschnittlich sehr niedrigen Korrelationskoeffizienten (r : 0,89 - 0,63) spiegeln den beschriebenen steilen terminalen Abfall der X-chromosomalen Syntheseaktivität wieder; die Abhängigkeit zwischen X-chromosomaler und autosomaler Markierung kann bei den jüngeren Frauen nicht durch eine Gerade gekennzeichnet werden.

Altersgruppe 3 läßt sich anhand der Korrelationskoeffizienten wiederum auftrennen in 2 Individuen, die mit 0,96 (54 Jahre), bzw. 0,94 (58 Jahre) eine lineare Abhängigkeit ähnlich der Altersgruppe 1 andeuten, sowie 2 Individuen, die mit $r = 0,66$ (55 Jahre), bzw. $r = 0,54$ (56 Jahre) eine solche Abhängigkeit entsprechend Altersgruppe 2 vermissen lassen. - Wegen der großen Streuung der Einzelwerte ist der Korrelationskoeffizient der 50 jährigen Probandin in diesem Zusammenhang nicht sicher zu verwerten.

53-22: Achsenabschnitt a

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y -Achse veranschaulicht die unterschiedliche Höhe der X-chromosomalen

Mittlere X chromosomale Markierung in Abhängigkeit vom Markierungsgrad der Autosomen (2n-X)

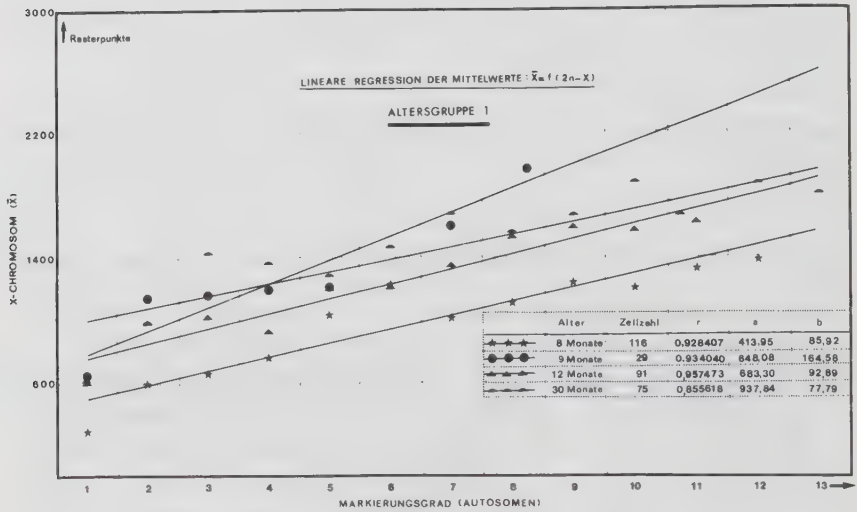


Fig. 12 a

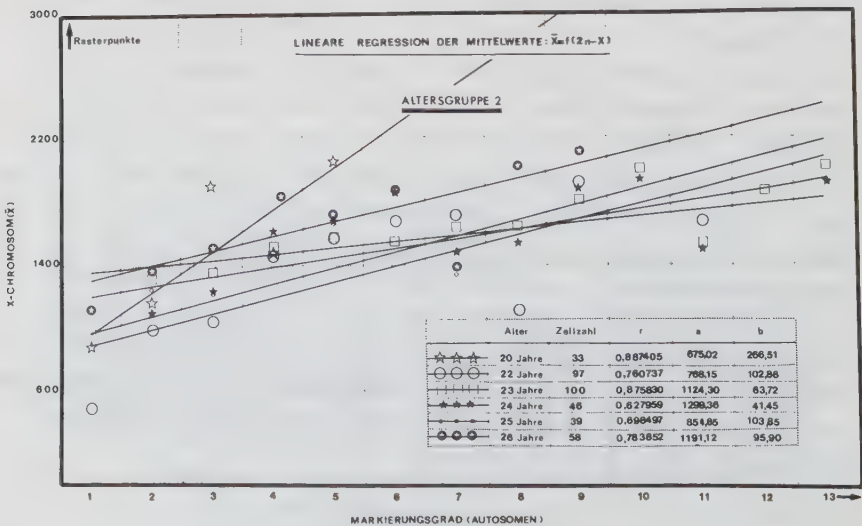


Fig. 12 b

Mittlere X chromosomale Markierung in Abhängigkeit vom Markierungsgrad der Autosomen (2n-X)

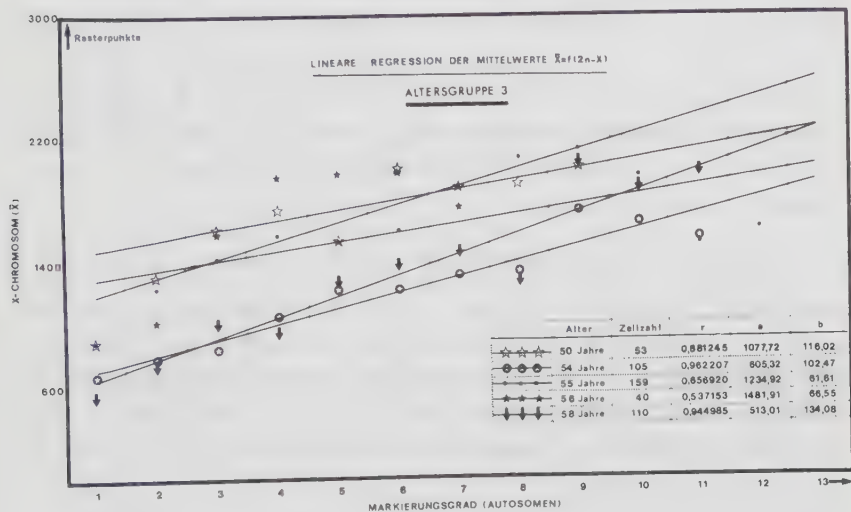


Fig. 12 c

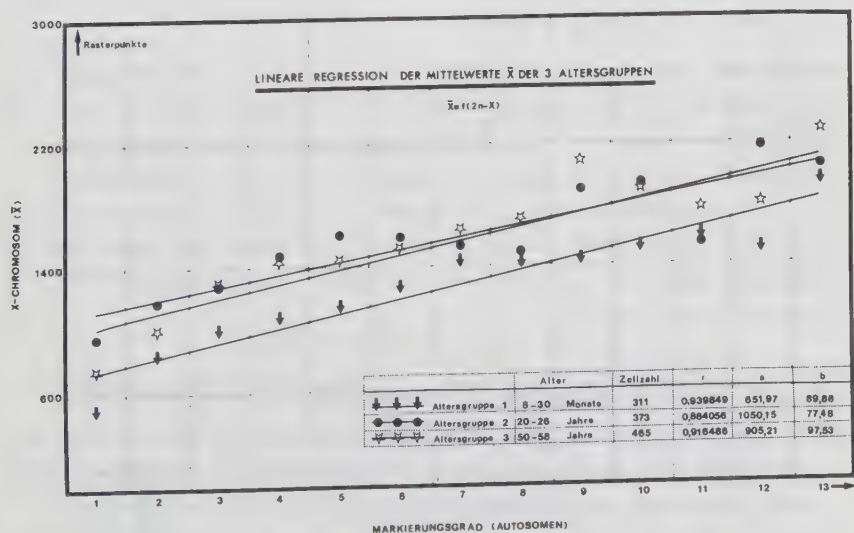


Fig. 12 d

Markierung bei den einzelnen Individuen. Achsenabschnitte über 1000 Rasterpunkte zeigen die 23, 24, 50, 55 und 56 jährige Probandin. In einem wesentlich niedrigeren Bereich liegen die Achsenabschnitte in der Altersgruppe der Kinder und der beiden älteren Probandinnen (54 und 58 Jahre). Für das 30 Monate alte Mädchen, sowie für die 20, 22 und 25 jährige Probandin wurden Achsenabschnitte ermittelt, die in einem Übergangsbereich zwischen Altersgruppe 1 und 2 liegen.

53-23: S t e i g u n g

Die Werte b für die Steigung der Regressionsgeraden weisen große, scheinbar unsystematische Schwankungen auf. Da sie in erster Linie auf die unterschiedlich große Anzahl von Meßwerten und deren unterschiedliche Verteilung auf der x -Achse zurückgehen, kann die Steigung der Regressionsgeraden bei den einzelnen Individuen nicht zur Charakterisierung des Heterozyklieverhaltens herangezogen werden.

53-24: L i n e a r e R e g r e s s i o n d e r M i t t e l w e r t e d e r 3 A l t e r s - g r u p p e n

Berechnet man die lineare Regression der Mittelwerte für die X-chromosomale Markierung (X) ohne Berücksichtigung der Einzelindividuen für die 3 Altersgruppen (Fig. 12 d), so zeigt sich wiederum ein niedriger Korrelationskoeffizient für die Altersgruppe 2 ($r = 0,88$) im Vergleich zur Altersgruppe 1 ($r = 0,94$), sowie eine unterschiedliche Höhe der Achsenabschnitte bei relativ ähnlicher Steigung der 3 Regressionsgeraden.

54: HOMOGENITÄTSPRÜFUNG INNERHALB DER 3 ALTERSGRUPPEN

Mit dem H-Test wurde nun wiederum geprüft, ob die einzelnen Individuen innerhalb der drei Altersgruppen einer gemeinsamen Grundgesamtheit entstammen oder nicht. Dabei ergab sich (Tab. 3 b), daß zwischen der Lage der Werte der Stichproben

E - K (Altersgruppe 2) in 3 der 5 ersten Markierungsgrade keine signifikanten Unterschiede auf dem 5 %-Niveau bestehen. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Werte für die 4 Individuen der Altersgruppe 1 in 3 von 4 Markierungsgraden als

Markierungsgrad		1	2	3	4	5	1 - 5
ALTERS- GRUPPE 1 (A-D)	n	-	39	41	31	25	136
	k	-	4	4	3	3	14
	$\hat{\Pi}$	-	14,53	17,27	9,15	3,18	44,13
	X^2 0,1 %	-	<u>16,27</u>	16,27	<u>13,82</u>	<u>13,82</u>	34,53
	1,0 %	-	11,35	11,35	<u>9,21</u>	<u>9,21</u>	27,69
	5,0 %	-	7,81	7,81	5,99	<u>5,99</u>	22,36
ALTERS- GRUPPE 2 (E-K)	n	48	42	49	54	36	229
	k	4	5	5	5	4	23
	$\hat{\Pi}$	11,80	8,31	7,13	11,49	2,95	41,68
	X^2 0,1 %	<u>16,27</u>	<u>18,47</u>	<u>18,47</u>	<u>18,47</u>	<u>16,27</u>	<u>48,27</u>
	1,0 %	11,35	<u>13,28</u>	<u>13,28</u>	<u>13,28</u>	<u>11,35</u>	40,29
	5,0 %	7,81	<u>9,49</u>	<u>9,49</u>	9,49	<u>7,81</u>	33,92
ALTERS- GRUPPE 3 (L-P)	n	49	63	73	71	59	315
	k	4	5	5	5	4	23
	$\hat{\Pi}$	8,82	19,39	31,34	36,30	16,01	111,86
	X^2 0,1 %	<u>16,27</u>	18,47	18,47	18,47	<u>16,27</u>	48,27
	1,0 %	<u>11,35</u>	13,28	13,28	13,28	11,35	40,29
	5,0 %	7,81	9,49	9,49	9,49	9,81	33,92

Tab. 5b: Π -Test nach KRUSKAL und WALLIS

n = Anzahl der Werte aller Stichproben; k = Anzahl der Stichproben; $\hat{\Pi}$ = Prüfgröße; X^2 = 0,1 %, 1 % und 5 % - Schranken der X^2 - Verteilung.

$\hat{\Pi} < X^2$: Die Werte widersprechen nicht eindeutig der Annahme einer gemeinsamen Grundgesamtheit (unterstrichen).

unterschiedlich, was auf die besonders niedrigen Werte des Individuums A (8 Monate) zurückgeführt werden könnte. In der Altersgruppe 3 waren, wie erwartet, in allen 5 untersuchten Markierungsgraden signifikante Unterschiede vorhanden. Prüft man das Vorhandensein von Unterschieden innerhalb der Altersgruppen auf dem etwas weniger kritischen 0,1 %-Niveau, so ergeben sich für die Altersgruppe 2 in allen 5 Markierungsgraden keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den 6 Individuen. Allerdings ist dann auch für Altersgruppe 3 der Nachweis signifikanter Unterschiede nicht mehr in allen Markierungsgraden zu erbringen, obwohl diese Altersgruppe aufgrund der Punktwolken- und Mittelwertdiagramme als inhomogen anzusehen ist. Faßt man die Ergebnisse des H-Testes für die 5 Markierungsgrade zusammen (Tab. 5 b), so zeigt sich, daß die Werte der 6 Individuen in Altersgruppe 2, im Gegensatz zu Altersgruppe 1 und 3, auf dem 0,1 % - Niveau nicht mehr der Annahme einer gemeinsamen Grundgesamtheit widersprechen.

55: ÜBERPRÜFUNG DER ERGEBNISSE MIT HILFE DES HETEROZYKLIE-QUOTIENTEN $X: (2n-X)$

Da die Einzelwerte für die autosomale Markierung ($2n-X$), wie die methodischen Messungen zeigten, mit einem bis zu 10 %igen Fehler behaftet sind, schien eine Überprüfung der vorliegenden Unterschiede im Heterozyklieverhalten durch Untersuchung der Heterozyklienquotienten $X: (2n-X)$ der 3 Altersgruppen angebracht. Dieser Quotient repräsentiert einen Wert für die X-chromosomale Heterozyklie unabhängig vom Stadium der DNS-Synthese, in der sich die untersuchte Zelle befindet. Zudem verkleinert sich der durch die subjektive Kennung vor jeder Messung auftretende Fehler durch die Quotientenbildung aus den zwei Meßgrößen X und $(2n-X)$.

HETEROZYKLIEQUOTIENT $X:(2n-X)$

Häufigkeitsverteilung

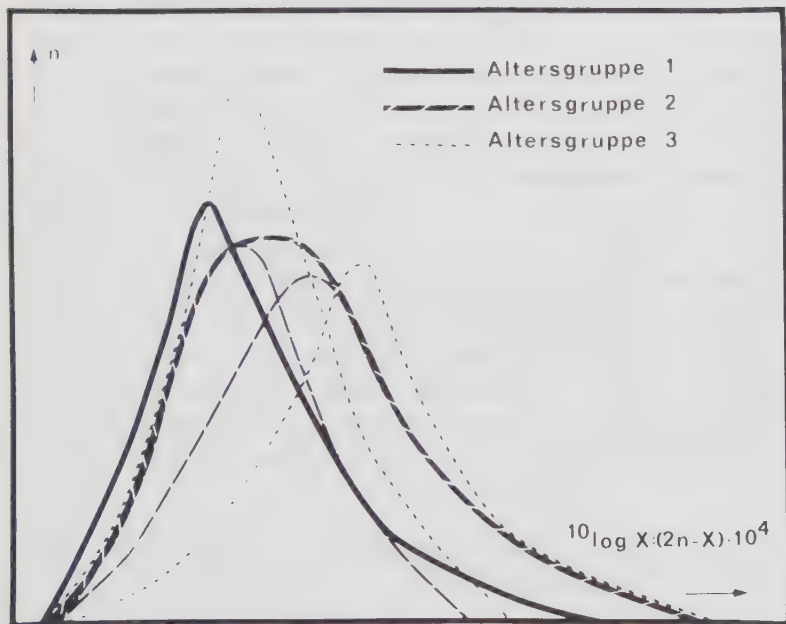


Fig. 13: (Abszisse: Heterozyklienquotient, Ordinate: Häufigkeit)

Unter Verwendung der gruppierten Rohwerte für die Heterozyklienquotienten erhält man nach rechts flach auslaufende Häufigkeitsverteilungen, die links durch den Wert Null begrenzt sind. Nach Logarithmieren der Einzelwerte ($10 \log X:(2n-X) \cdot 10^4$) und Gruppierung in 14 Klassen waren die Häufigkeiten der Heterozyklienquotienten der 3 Altersgruppen angenähert normalverteilt (Fig. 13). Die Häufigkeitsverteilung der Altersgruppe 1 ist eingipflig, wobei der Gipfel (Medianwert) gegenüber den beiden anderen Altersgruppen deutlich nach links, d. h. zu niedrigeren Heterozyklienwerten verschoben ist. Die Heterozyklienwerte der Altersgruppe 2 zeigen im Gegensatz zu Altersgruppe 1

keinen ausgeprägten Gipfel. Es ist nicht sicher zu erkennen, ob es sich um eine ein- oder zweigipflige Verteilung handelt. Deutlich zu erkennen ist jedoch das Vorliegen höherer Heterozyklienquotienten im Vergleich zu Altersgruppe 1.

Die Häufigkeitsverteilung der Heterozyklienquotienten in Altersgruppe 3 hat Ähnlichkeit mit derjenigen der Altersgruppe 2. Sie ist jedoch deutlicher zweigipflig, wobei der Hauptgipfel unmittelbar rechts (höhere Werte) an den Gipfel der Verteilung für Altersgruppe 1 anschließt. Der zweite, weniger stark ausgeprägte Gipfel zeigt etwas höhere Werte für die X-chromosomale Heterozyklie an, als für Altersgruppe 2 ermittelt wurden.

Mit dem U-Test wurde die Nullhypothese geprüft: die Heterozyklienquotienten der Altersgruppen 1 und 2 entstammen der gleichen Grundgesamtheit (gleiche Verteilungsfunktion). Nach Berechnung der Prüfgröße U wurde der Wert $\hat{z}$ mit Hilfe der Approximation

$$\hat{z} = \frac{U - \frac{m \cdot n}{2}}{\sqrt{\frac{m \cdot n (m+n+1)}{12}}}$$

ermittelt. Danach mußte die Nullhypothese verworfen werden. Die Heterozyklienquotienten der Altersgruppen 1 und 2 zeigen hochsignifikante Unterschiede ($P = 0,000001$) in der zentralen Tendenz, sowie in der Lage der Medianwerte (Tab. 6).

m	n	U1	U2
305	372	76512,50	36912,50

$$\hat{z} = 7,7994; z = 4,7534 \quad (p = 0,000001)$$

Tab. 6 U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY

m = Anzahl der Werte in Altersgruppe 1

n = Anzahl der Werte in Altersgruppe 2

$\hat{z}$ = Prüfgröße nach Approximation

z = kritischer Tabellenwert

$z < \hat{z}$: Die Heterozyklienquotienten der Altersgruppe 1 und 2 unterscheiden sich mit hoher Signifikanz ($p=10^{-6}$).

Nach Anwendung des H-Tests wurden für die einzelnen (k) Individuen der 3 Altersgruppen noch auf dem 0,1 %-Niveau Unterschiede gefunden, d.h. die Heterozyklienquotienten der 3 Altersgruppen entstammen nicht nachweislich aus der gleichen Grundgesamtheit (Tab. 7).

Altersgruppe	1	2	3
n	305	373	467
k	4	5	5
$\hat{H}$	36,69	89,28	35,81
χ^2	0,1 %	16,27	20,52
	1,0 %	11,35	15,09
	5,0 %	7,81	11,07

Tab. 7 H-Test nach KRUSKAL und WALLIS

n = Anzahl der Werte einer Stichprobe;

k = Stichprobenumfang;

$\hat{H}$ = Prüfgröße;

χ^2 = 0,1 %, 1 % und 5 % Schranken der χ^2 -Verteilung.

$\hat{H} > \chi^2$: Die Stichproben widersprechen der Annahme einer gemeinsamen Grundgesamtheit.

6: D I S K U S S I O N

61: BISHER DURCHGEFÜHRTE QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN
DER X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE

61-1: BESTIMMUNG DER SILBERKORNZAHLEN ÜBER DEM X-CHROMOSOM,
 BEZOGEN AUF DEN MARKIERUNGSGRAD DER AUTOSOMEN ($2n-X$).

Die bisher in der Literatur beschriebenen quantitativen Untersuchungen der X-chromosomalen Heterozyklie durch Körnerzählung dienten vorwiegend der Charakterisierung numerisch, bzw. strukturell aberranter, im Vergleich zu normalen X-Chromosomen. Sie wurden gemeinsam von einer Autorengruppe um MULDAL, ROWLEY und GILBERT durchgeführt, und zwischen 1962 und 1964 publiziert. Als Bezugssystem für das heterozyklische Verhalten der X-Chromosomen diente die Markierung über den Autosomen ($2n$, bzw. $2n-X$). Diese wird dabei als Indikator für den Zeitraum der DNS-Syntheseperiode aufgefaßt, während der von einer Zelle 3H -Thymidin inkorporiert worden ist. Die Zusammenfassung der ermittelten Körnerzahlen in gleich große Gruppen (Markierungsgrade) ermöglicht eine Zeiteinteilung der späten S-Phase.

Um die X-chromosomale Heterozyklie zu den so erhaltenen Zeitpunkten zu untersuchen, wurde von den genannten Autoren die "X/45-Relation" bestimmt, das ist der mittlere prozentuale Anteil von Silberkörnern über dem heterozyklischen X-Chromosom für die einzelnen Markierungsgrade. Mit diesem System wurde von GILBERT et al. (1962) nach Untersuchung von 33 Zellen einer normalen Frau (ohne Altersangabe) die X-chromosomale Heterozyklie durch einen steigenden proportionalen Anteil von Silberkörnern bei abnehmender autosomalen Markierung charakterisiert (Fig. 14).

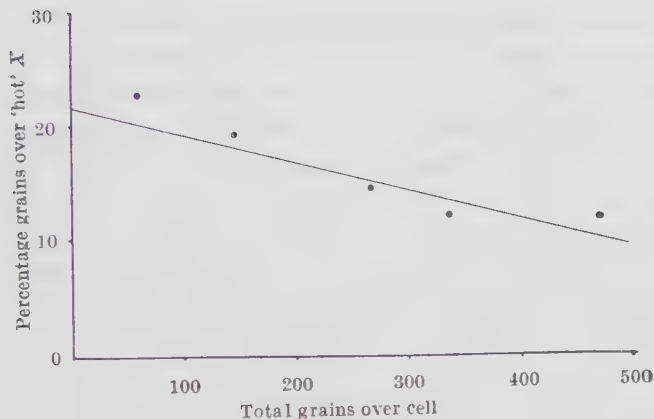


Fig. 14: GILBERT et al. (1962): Charakterisierung des X-chromosomalen Heterozyklieverhaltens

Dieses Heterozyklieverhalten diente als "Normalverhalten" beim Vergleich mit strukturell abberanten X-Chromosomen (X-Isochromosom: MULDAL et al. 1963; X-Ring-Chromosom: ROWLEY et al. 1964), sowie normal strukturierten, aber überzähligen X-Chromosomen (ROWLEY et al. 1963).

1965 untersuchten PFEIFFER und Mitarbeiter das Heterozyklieverhalten eines X-Ring-Chromosoms, und fügten zum Vergleich unter anderem Befunde von zwei normalen Frauen an. Bei der einen Probandin handelt es sich um eine 50-jährige gesunde Normalperson, es wurden 28 markierte Zellen untersucht (DISS. SCHARFENBERG W. 1967). Angaben über das Alter, bzw. die Zahl untersuchter Zellen bei der zweiten Normalperson liegen nicht vor.

61-2: VERGLEICHENDE BESTIMMUNG DER DNS-SYNTHESERATE
UBER X-CHROMOSOMEN UND AUTOSOMEN BEZOGEN AUF DEN
ZEITPUNKT DER S-PHASE.

Eine genauere quantitative Untersuchung der normalen X-chromosomalen Heterozyklie am Ende der DNS-Syntheseperiode führten GILBERT et al. (1965) an 224 Zellen durch, wobei nicht angegeben wurde, ob diese Zellen von einem oder mehreren Individuen stammten.

Nach Bestimmung der Häufigkeiten von Metaphaseplatten und X-Chromosomen mit bestimmten Körnerzahlen wurde unter Berücksichtigung des Zeitpunkts des Colcemidstopps eine Zeitskala aufgestellt, die der späten DNS-Syntheseperiode (180 - 150 min vor Beginn der Metaphase) entsprach.

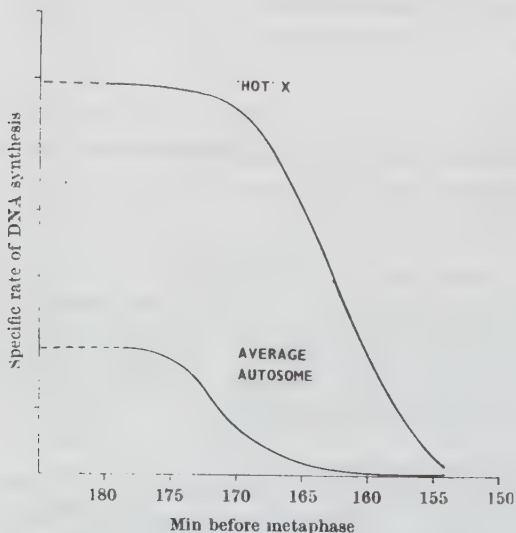


Fig. 15: GILBERT et al. 1965: Verhältnis der X-chromosomalen zur autosomalen Markierung am Ende der DNS-Syntheseperiode

In Fig. 15 ist die spezifische Rate der DNS-Synthese über X-Chromosom und Autosomen zu bestimmten Zeitpunkten vor der Metaphase wiedergegeben. Die DNS-Syntheserate ist am Ende der S-Phase konstant, und fällt während der letzten 20 Min. steil ab. Die konstant hohe Syntheseaktivität dauert im X-Chromosom etwa 5 Min. länger als im Durchschnitt der Autosomen. Dann sinkt sie ebenfalls steil ab, sodaß sowohl das X-Chromosom als auch der Durchschnitt der Autosomen etwa zur gleichen Zeit ihre Synthese beenden, und zwar 155 Min. vor Beginn der Metaphase.

61-3: UNTERSUCHUNG DER GESAMTEN REPLIKATIONSDAUER DES X-CHROMOSOMS IM VERGLEICH ZU DEN AUTOSOMEN.

In zahlreichen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß das heterozyklische X-Chromosom seine DNS-Replikation nicht nur später beendet, sondern auch später beginnt als die Autosomen (PETERSEN 1964, HSU u. LOCKHART 1964, KIKUCHI & SANDBERG 1964). COMINGS (1967) beobachtete nach Markierung der DNS-Synthese in Interphasekernen, daß der größte Teil der Replikation des heterochromatischen X-Chromosoms (Sex-Chromatin) während der letzten 1 1/2 Stunden der S-Periode stattfindet, während die euchromatischen Autosomen ihre DNS während eines Zeitraums von etwa 6 1/2 Stunden replizieren. Um zu einem gleichzeitigen Abschluß mit den Autosomen zu kommen, muß die X-chromosomale Replikation also schneller verlaufen, als die autosomale. COMINGS vermutete, daß diese schnellere Replikation auf dem X-Chromosom durch ein gleichzeitigeres Replizieren aller Chromosomenabschnitte erzielt wird ("greater unisono"), während in den Autosomen der Replikationsablauf weniger stark synchronisiert ist.

61-4: UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KONSTANZ DER NORMALEN X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE

Über die Konstanz des heterozyklischen Verhaltens normaler weiblicher X-Chromosomen berichtete GERMAN (1962) in jener Arbeit, die erstmals das auffallende Verhalten des

X-Chromosoms während seiner Replikation beschrieb:

"The cells with the group 6-X-12 chromosome heavily out of phase were not uncommon in cultures from three normal females, while they were rare in the case of the fourth. This suggests, that individual variations may occur, and that in cells from certain females it is not a common occurrence."

Angaben über das Alter der Frauen und die untersuchten Zellzahlen wurden nicht gemacht.

Von OCKEY (1969) wurden zwischen zwei Fibroblastenkulturen mit deutlichen morphologischen Unterschieden auch Unterschiede im Grad der Verspätung und der Syntheserate des spät replizierenden X-Chromosoms im Vergleich zu den Autosomen beobachtet.

An dieser Stelle sei auch eine Untersuchung von FITZGERALD (1971) über das Replikationsverhalten der G-Chromosomen erwähnt. Bei dem Versuch, die Replikationsmuster der G-Chromosomen in einzelnen Zellen auf die X-chromosomale Markierung zu beziehen, wurden bei den 5 untersuchten Individuen Variationen im Grad der Verspätung der X-chromosomalen gegenüber der autosomalen Replikation festgestellt.

61-5: QUANTITATIVE UNTERSUCHUNG DES MARKIERUNGSMUSTERS HETEROZYKLISCHER X-CHROMOSOMEN

Zur quantitativen Untersuchung der X-chromosomalen Heterozyklie wurde außer der Körnerzahl auch die Bestimmung des Markierungsmusters des X-Chromosoms zu verschiedenen Zeitpunkten der späten S-Phase (Körnerzahlen über den Autosomen) herangezogen. GIANNELLI (1970) gab nach Auswertung von 132 Zellen zweier normaler Frauen folgende morphologische Normalkriterien an (Fig. 16):

- A) X-Chromosom vollständig markiert (vorwiegend in Zellen mit hoher Körnerzahl über den Autosomen)
- B) X-Chromosom markiert bis auf die Zentomerregion (mittlere und wenig Körnerzahlen über den Autosomen)
- C) X-Chromosom unmarkiert bis auf die proximale Region der langen Arme (fast ausschließlich Zellen mit sehr geringen Körnerzahlen über den Autosomen)

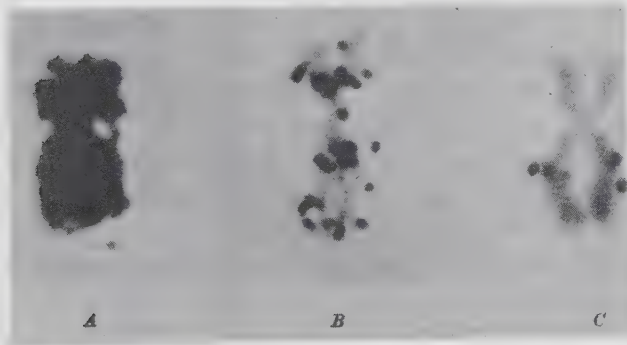


Fig. 16: GIANNELLI (1970): X-chromosomale Replikationsmuster bei starker (A), mittlerer (B) und schwacher (C) autosomaler Markierung

Unterschiede in der Ausprägung dieser X-chromosomalen Markierungsmuster wurden von einigen Autoren bei Patienten mit X-Polysomien festgestellt (GRUMBACH et al. 1963, MUKHERJEE et al. 1964, und GIANNELLI 1970). ATKINS u. GUSTAVSON (1964) beschrieben einen Unterschied des Markierungsmusters zwischen dem heterozyklischen X-Chromosom eines Klinefelterpatienten (47, XXY) und dem normaler Frauen, der mit einer submikroskopischen strukturellen Aberration interpretiert wurde. Andere Autoren konnten keine Unterschiede im Heterozyklieverhalten normaler und numerisch aberranter X-Chromosomen feststellen (LINDSTEN et al. 1966, WENNSTRÖM und de la CHAPELLE 1967).

61-6: ZUSAMMENFASSUNG

Während die verspätete Replikation als morphologisches Merkmal des X-Chromosoms in einer Vielzahl von Untersuchungen bestätigt worden ist, fehlen unseres Wissens systematische Untersuchungen über die Konstanz und die Stärke der Ausprägung dieses Merkmals.

62: KRITISCHE STELLUNGNAHME ZU DEN EIGENEN ERGEBNISSEN

Über die Konstanz der X-chromosomalen Heterozyklie kann in der vorliegenden Untersuchung insoweit keine Aussage gemacht werden, als Zellen ohne erkennbar spät replizierendes X-Chromosom nicht in die Auswertung einbezogen wurden. Es wurde lediglich die Stärke der X-chromosomalen Replikationsverspätung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß es nicht möglich ist, anhand der untersuchten 15 Individuen "Normalkriterien" für die Verspätung der X-chromosomalen im Vergleich zur autosomalen DNS-Replikation aufzustellen. Es wurden vielmehr Schwankungen in der Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie festgestellt, die in einem gewissen Zusammenhang mit dem Lebensalter der untersuchten Probandinnen zu stehen scheinen.

Im Folgenden soll zur Diskussion gestellt werden, inwieweit diese Beobachtungen als methodisch bedingte Artefakte aufgefaßt werden müssen, oder eine individuell variable Eigentümlichkeit dieses Chromosoms darstellen, oder einen Hinweis auf echte funktionell variable Zustände dieses Chromosoms geben.

62-1: AUSWAHL DES PROBANDENMATERIALS

Die Auswahl der Probanden erfolgte zufällig unter dem Gesichtspunkt weiblicher Individuen unterschiedlichen Alters. Aus rein praktisch-technischen Gründen setzt sich das Probandenmaterial bezüglich der Kinder und älteren Frauen aus Patientinnen der Kinderklinik und der nuklearmedizinischen Poliklinik der Universität Marburg zusammen,

während es sich bei der mittleren Altersgruppe um Normalpersonen handelt.

Es ist unwahrscheinlich, daß die zur Zeit der Blutentnahme vorliegenden Erkrankungen der Kinder (Tab. 1: A: Pharyngitis, Dyspepsie, Rachitis; B: BNS-Krämpfe; C: Enteritis; D: spastische Bronchitis) einen Einfluß auf das X-chromosomale Heterozyklieverhalten hatten. Zu erwähnen ist, daß das 30 Monate alte Mädchen (Fig. 10 D) am ersten Behandlungstag 50 mg Solu-Decortin i.m. appliziert bekam. Die Blutentnahme für die Lymphocytenkultur erfolgte zwar am Ende des 10-tägigen Klinikaufenthaltes, doch ist eine Beeinflussung des Heterozyklieverhaltens durch das Corticoid nicht sicher auszuschließen. Die Werte für die X-chromosomale Markierung lagen bei diesem Kind durchschnittlich etwas höher als bei den übrigen 3 kindlichen Probandinnen, die nicht mit stark wirksamen Medikamenten behandelt worden waren (Fig. 11 a)

Die Patientinnen der Schilddrüsenprechstunde aus der nuklearmedizinischen Poliklinik waren in einem euthyreoten Zustand außer der 58-jährigen Patientin (Fig. 10 P) mit Hyperthyreose bei Struma nodosa. Dies ist insofern von Bedeutung, als ein starker Effekt des Thyroxin auf den Metabolismus von Steroidhormonen bekannt ist (LIPSETT 1972). Der Nachweis einer erniedrigten Sexchromatinfrequenz bei Hypothyreosen (HOLFUGEL und WURSTER, 1971) könnte an eine Beeinflussung der X-chromosomalen Heterozyklie durch Thyroxin denken lassen. Die Stärke der X-chromosomalen Markierung dieser Patientin (Fig. 10 P) weist starke Ähnlichkeit mit derjenigen der 54-jährigen Probandin (Fig. 10 M) und des jüngsten Kindes (Fig. 10 A) auf. Ein direkter Hormoneinfluß läßt sich daraus nicht ablesen.

Was die geschlechtsreifen Normalpersonen betrifft, so muß berücksichtigt werden, daß die Blutentnahme wahrscheinlich zu verschiedenen Zeitpunkten während des menstruellen

Zyklus erfolgt ist, und daß möglicherweise Hormone in Form von Ovulationshemmern exogen zugeführt wurden. Eine Befragung der Probandinnen über Menstruation, bzw. den Gebrauch von Contraceptiva wurde zu Beginn der Untersuchung nicht durchgeführt, und konnte nach Vorliegen der Ergebnisse nicht nachgeholt werden.

62-2: ZEITPUNKT DES KULTURANSATZES

Die Lymphocytenkulturen wurden in zufälliger Reihenfolge unabhängig vom Alter der einzelnen Probandinnen angesetzt. Wegen einer teilweise zu geringen Mitoseausbeute kamen nur 15 der insgesamt 50 angesetzten Blutkulturen zur Auswertung. Auf der Suche nach eventuell vorhandenen methodischen Ursachen fanden wir eine auffällige Übereinstimmung, zwischen Ähnlichkeit des Heterozyklieverhaltens einzelner Individuen und dem Zeitpunkt des Kulturansatzes. Die ersten 4 angesetzten Kulturen, die zur Auswertung kamen, waren diejenigen des 8 und 30 Monate alten Kindes, sowie der 54 und 58 jährigen Probandin. Darauf folgte ohne größere zeitliche Unterbrechung und ohne Veränderung in den Kultur- und Präparationsbedingungen (Medium TC 199) der Reihenfolge nach die 50, 56, 20, 55 und 26 jährigen Probandin angesetzt. Den Abschluß der Untersuchungen bildete, ebenfalls unter Verwendung von Mac COY-Medium das 9 und 12 Monate alte Kind, sowie zuletzt die 24-jährige Probandin.

Da die Autoradiographien in der gleichen Reihenfolge exponiert und entwickelt wurden, läßt sich ein Einfluß unbekannter Kultur-, bzw. präparationsbedingter Faktoren auf die Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie nicht mit Sicherheit ausschließen.

62-3: INDIVIDUELLE VARIANTEN

Durch diese Untersuchung kann ferner nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß funktionell bedeutungslose, individuelle Schwankungen in der Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie existieren, da keine mehrfach Untersuchungen der gleichen Individuen vorgenommen wurden. Man sollte jedoch annehmen, daß individuelle Varianten zu einer insgesamt stärkeren Variabilität im Heterozyklieverhalten führen würden.

62-4: EINFLUSS VON PHA UND SCHWANKUNGEN IN DER DAUER DER G_2 -PHASE

Schwankungen im Verhalten der Zellen in Kultur können auf eine unterschiedliche Stimulierbarkeit individueller Lymphozyten durch PHA, bzw. auf individuelle Schwankungen in der Dauer der G_2 -Periode zurückgeführt werden. Der Wirkungsmechanismus von PHA ist noch weitgehend unbekannt. Es scheint jedoch ein direkter Effekt auf den Zellstoffwechsel vorzuliegen (RNS, Fett, Proteine, Histone; LOEB und AGARVAL 1971), der möglicherweise auf eine Aktivierung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zurückzuführen ist (MACMANUS und WHITEFIELD 1969; SMITH et al. 1971). Morphologisch zeigt sich nach PHA-Stimulierung in Kernen von Lymphozyten ein Übergang von dicht gepacktem Heterochromatin bei ruhenden Lymphozyten in ein fibrilläres, locker gepacktes Euchromatin (HIRSCHHORN et al. 1971). Man vermutet, daß PHA seine Lymphocyten transformierenden Fähigkeiten nach Haftung an der Kernmembran entfaltet (KORNFELD 1969). Es besteht jedoch kein Anhalt dafür, daß bei dieser allgemeinen PHA induzierten Genomaktivierung einzelne Chromosomen bevorzugt oder benachteiligt werden, da keine Unterschiede zu den Replikationsmustern von Metaphaseplatten aus sich spontan teilenden Zellkulturen beobachtet werden können (PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA A. et al. 1968, GAVOSTO et al. 1968, OCKEY 1969).

Unter gleichen Versuchsbedingungen erhaltene Unterschiede in der Häufigkeit markierter Metaphaseplatten können darüber hinaus auch auf Variationen in der Länge der G_2 -Periode bei einzelnen Individuen zurückgehen (FITZGERALD 1971). Zellpopulationen mit einer kürzeren durchschnittlichen G_2 -Periode weisen einen größeren durchschnittlichen Anteil markierter Metaphaseplatten mit starker Gesamtmarkierung auf, als Zellpopulationen mit längerer durchschnittlicher Dauer der G_2 -Periode. Dadurch wird zwar die Zahl der Zellen mit deutlich heterozyklischem X-Chromosom beeinflusst, Schwankungen in der Ausprägung der Heterozyklie können jedoch bei individuell variabler Dauer der G_2 -Periode nicht erwartet werden.

62-5: QUANTITATIVE CHROMOSOMENAUTORADIOGRAPHIE

"Autoradiographie kann als quantitativ angesehen werden, wenn ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen dem relativen Gehalt radioaktiven Materials in einer besonderen Region der markierten Probe und der relativen Körnerzahl, die mit dieser Region assoziiert ist, festgestellt werden kann" (PERRY 1964). Es stellt sich die Frage, inwieweit die vorliegenden Chromosomenautoradiographien quantitativ auswertbar sind.

62-51: β -Strahlung

Die beim Tritiumzerfall (Halbwertszeit 12,3 Jahre) frei werdenden β -Partikel sind Elektronen, die nicht alle die gleiche Initialenergie und damit die gleiche Reichweite haben. Die maximale Strahlungsreichweite beträgt beim Tritiumzerfall in feinkörnigen Emulsionen etwa 2 μ (CARO und SCHNOES 1965). Wegen ihrer geringen Masse werden sie beim Kontakt mit Materie sehr stark gestreut, ihre Bahn ist nicht vorhersagbar. Nur etwa die Hälfte der während der Expositionszeit emittierten β -Teilchen fliegt in Richtung auf die Emulsion (ROGERS 1967, HERZ 1969, FISCHER und WERNER 1971) (Fig. 17).

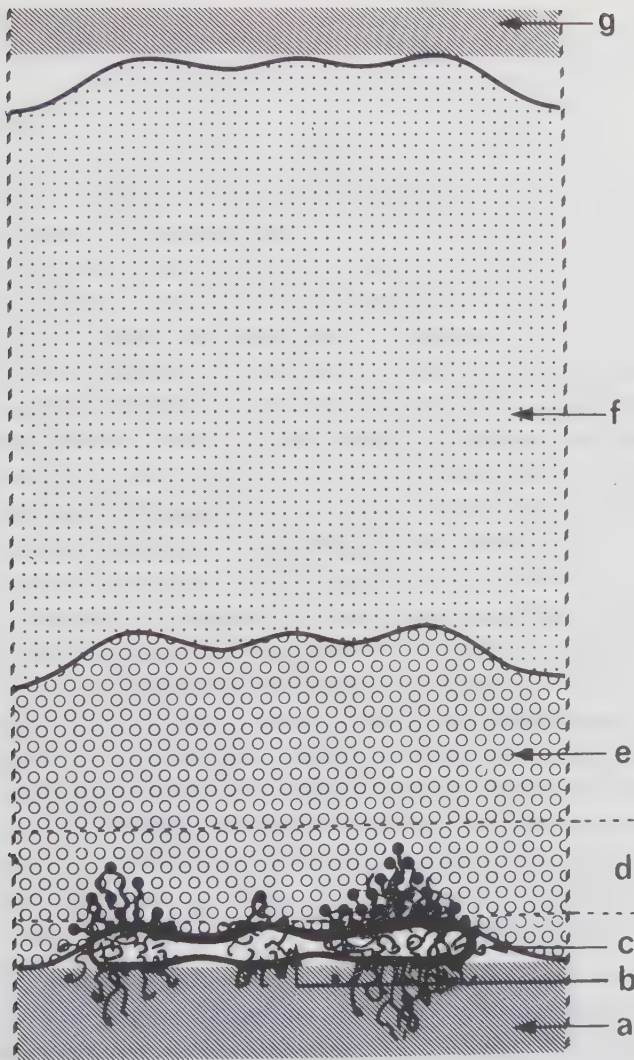


Fig. 17: Schematischer Querschnitt durch eine Chromosomen-autoradiographie (AR-10 Strippingfilm)

- a) Objektträger
- b) Chromosom; Durchmesser 1 μ
- c) β -Strahlung; maximale Reichweite 2 μ
- d) axiales Auflösungsvermögen (Fokusbereich) 1,6 μ
- e) NuklearemulSION, Durchmesser 5 μ , Silberbromidkristalle (o), mittlerer Kristalldurchmesser 0,2 μ ; entwickelbare Kristalle (o)
- f) Gelatine-Trägerschicht (10 μ)
- g) Deckglas

62-52: Inkorporation von ^3H - Thymin in die chromo- somale DNS

^3H -Thymin ist als spezifischer und direkter Vorläufer der DNS nachgewiesen. Es wird nicht in nennenswertem Ausmaß metabolisiert, sodaß die radioaktiven Orte in den Chromosomen mit den Orten der Inkorporation von Thymin identisch sein dürften. Durch Waschvorgänge bei der autoradiographischen Prozedur kann das inkorporierte Tritium allerdings wieder entfernt werden (ROWINSKI 1971), sodaß Waschungen nur kontrolliert durchgeführt werden dürfen. Die Menge des zugegebenen ^3H -Thymidins ist so hoch, daß der Einbau endogenen Thymidins bei der Replikation vernachlässigt werden kann. Eine Änderung des Gleichgewichts im Basenhaushalt durch Überschuß an Thymin dürfte zu keiner Veränderung des Replikationsablaufs führen, da die zum Einbau in den DNS-Strang notwendige Phosphorylierung des Thymidins Rückkopplungskontrollen unterliegt, wobei die Thymidinkinaseaktivität durch Thymin-Triphosphat gehemmt wird (POTTER und NYGAARD 1963). Das im Handel erhältliche ^3H -Thymin ist relativ stabil. Es wird eine Zersetzungsrate von 1 % pro Monat angegeben. Da mehr als drei Monate alte Chargen für die vorliegenden Versuche nicht verwendet wurden, kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch altes ^3H -Thymin ausgeschlossen werden.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen wird das ^3H -Thymin in die sog. "spät replizierenden" Abschnitte des vielfach gefalteten DNS-Moleküls inkorporiert. Es handelt sich also bei markierten Chromosomen nicht um diskrete Strahlenquellen, sondern um mehr oder weniger diffuse Anreicherungen von Aktivität über verschiedenen Arealen der Chromosomen einer Metaphaseplatte (Fig. 17).

Dabei ist zu berücksichtigen, daß möglicherweise Chromosomenabschnitte mit einem konstitutionellen Thymidinreichtum (A1-reiche Abschnitte: PACHMANN und RIGLER 1972; ELLISON und BARR 1972, WEISBLUM und HASETH 1972) stärker markiert werden, als Chromosomenareale, in denen das Thymin zufällig unter den 4 Basenpaaren verteilt ist.

Auch ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß Chromosomenareale ohne die Base Thymidin existieren (GC-reiche Abschnitte: HSU et al. 1972), die trotz später Replikation unmarkiert erscheinen, und von früh replizierenden Abschnitten nicht unterschieden werden können. Inwieweit solche lokalisierten Basensequenzen auf den Chromosomen das Muster des Zeitablaufs der DNS-Synthese beeinflussen, ist gegenwärtig nicht sicher abzuschätzen. Neuere Literaturberichte weisen darauf hin, daß früh replizierende DNS durch einen GC-Reichtum und spät replizierende DNS durch einen AT-Reichtum ausgezeichnet ist (TOBIA A.M. et al. 1970, FLAMM W.G. et al. 1971, BOSTOCK C. J., PRESKOTT D.M. 1971, COMINGS D.E. 1972). Dies würde den Beobachtungen entsprechen, daß in frühen Stadien der S-Phase das spät replizierende X-Chromosom mit ^3H -Thymidin unmarkiert bleibt (PETERSEN 1964; HSU und LOCKHART 1964; OCKEY et al. 1969). Andererseits kann die starke Inkorporation von ^3H -Thymidin in das X-Chromosom während der späten S-Phase nicht auf einen konstitutionellen Thymidinreichtum zurückgeführt werden, da die Heterozyklie eines der beiden X-Chromosomen weiblicher Zellen zufällig betrifft, sodaß kein konstitutioneller Unterschied zwischen diesen Chromosomen vorliegen kann.

62-53: Bedeutung der Chromosomenstruktur für die quantitative Autoradiographie

Menschliche Metaphasechromosomen sind etwa 0,6 μ dick und haben unterschiedliche Längen zwischen 1 und 10 μ (duPRAW 1969). Entsprechend der unterschiedlichen Packung des Chromatin, bzw. dem unterschiedlichen Gehalt an Nukleoproteinen schwankt ihre Dichte. Die Zentromerregion ist z.B. weniger dicht als andere Chromosomenabschnitte (COMINGS und OKADA 1970). Wegen der unvollkommenen Synchronisation PMA-stimulierter Lymphozytenkulturen sind, trotz standardisierter Präparationstechnik Schwankungen im Spiralisationsgrad der Chromosomen nicht zu vermeiden. Auch unterschiedlich

starke Überlagerungen der Metaphaseplatten mit Zytoplasma, die von Präparation zu Präparation schwanken können, lichtmikroskopisch jedoch nicht kontrollierbar sind, führen zu Änderungen in der Dichte der Strahlenquellen. Die quantitative Autoradiographie ist durch solche Unterschiede stark beeinträchtigt, da Selbstabsorption der β -Strahlen im Gewebe stattfindet. Nur ein Bruchteil der β -Teilchen tritt aus dem Gewebe aus und kann Silberkörner erzeugen. Etwa 90 % aller Silberkörner rühren nur von solchen β -Partikeln her, die aus der obersten Schicht eines Objekts emittiert werden (MAURER und PRIMBSCH 1964). Die genannten Autoren wiesen nach, daß die β -Selbstabsorption eine der größten Fehlerquellen bei der quantitativen Tritiumautoradiographie ist. Durch Bestimmung der Masse pro Flächeneinheit der untersuchten Zellstrukturen wurden Selbstabsorptionskoeffizienten ermittelt und als Korrekturfaktoren eingesetzt. Bei den vorliegenden Autoradiographien ist die β -Selbstabsorption jedoch schwer überschaubar, da die Massenverteilung innerhalb der Chromosomen nicht homogen ist. Eine Verlässliche Korrektur der Silberkornzahlen ist in diesem Fall nicht möglich. Da man jedoch unter standardisierten Bedingungen reproduzierbare Replikationsmuster erhält, die nicht vom Spiralisationsgrad der Chromosomen, nicht von ihrer Dichte, sondern allein vom Replikationszeitpunkt der zugrundeliegenden DNS abhängen, kann die Bedeutung der β -Selbstabsorption als Fehlerquelle bei der quantitativen Chromosomenautoradiographie, insbesondere bei Auswertung eines großen Zellmaterials empirisch eingeschränkt werden. Starke Markierung der Zentromerregionen (MORISHAMA et al. 1962; MOORHEAD und DEFENDI 1963; SCHMID 1963; GERMAN 1964; KIKUCHI und SANDBERG 1964; BIANCHI und de BIANCHI 1965) sind mit Sicherheit auf die Besonderheiten der zugrundeliegenden DNS zurückzuführen, nicht auf Unterschiede in der Ausbreitung und Registrierbarkeit der β -Strahlen gegenüber anderen Chromosomenabschnitten. Eine Beeinflussung der quantitativen Werte der X-chromosomalen Heterozyklie durch diese Fehler-

quelle muß jedoch als zufällig angesehen werden, da es sich weder um chromosomenspezifische, noch um individualspezifische Störfaktoren handelt.

Für das X-Chromosom wurde darüberhinaus von GIANNELLI (1967) durch Körnerzählung nachgewiesen, daß keine Korrelation zwischen der Länge (Spiralisationsgrad) und der Markierungsdichte nach Autoradiographie besteht.

62-5/4: Strippingfilm

Beim KODAK AR 10 Strippingfilm sind die Dicke der Emulsionsschicht (5μ), die Größe der Silberhalogenidkristalle (mittlerer Durchmesser etwa $0,2 \mu$), sowie die Kornverteilung und Strahlungsempfindlichkeit wegen der fabrikmäßigen Herstellung relativ konstant, sodaß dieser Filmtyp alle Voraussetzungen für ein reproduzierbares qualitatives und quantitatives Arbeiten erfüllt (FISCHER und WERNER 1971). Die Uniformität der Emulsionsschicht wird von KODAK mit einer Variationsbreite von $\pm 10\%$ angegeben. Um beim AR 10 Strippingfilm ein Silberhalogenidkristall entwickelbar zu machen, sind - statistisch gesehen - mehrere β -Zerfälle notwendig (durchschnittlich 2,4: MAUER und PRIMBSCH 1964).

β -Partikel, welche in die Emulsion eindringen, können Silberionen an sensitiven Stellen der Kristalle in Atome verwandeln. Eine variable Anzahl von Atomen metallischen Silbers (10-1000) stellt das latente Bild dar. Ein Kristall kann entsprechend der Anzahl sensitiver Stellen auch mehr als ein latentes Bild enthalten (ROGERS 1967). Es ist bisher nicht bekannt, inwieweit die Menge atomaren Silbers in einem Kristall eine Funktion der Aktivierungsanreicherung in der zugrundeliegenden markierten Struktur darstellt.

Eine Fehlerquelle bei der Registrierung der β -Strahlen in der Emulsion stellt die Koinzidenz, d. h. das Zusammentreffen mehrerer Strahlungsquanten am Ort desselben Silberkorns (DORNER 1967) dar. Da die Aktivitätsanreicherung in den verschiedenen Arealen einer markierten Metaphaseplatte entsprechend der zugrundeliegenden DNS unterschiedlich ist, kann

das Ausmaß der Koinzidenz in Chromosomenautoradiographien nicht quantitativ erfaßt werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß über dem heterozyklischen X-Chromosomen häufig Mehrfachaktivierungen vorkommen, sodaß die entwickelten Silberkörner von einem Sättigungswert an ein zu niedriges Maß für die tatsächliche Markierungsstärke dieses Chromosoms sind.

Da die Silberhalogenidkristalle beim AR 10 Strippingfilm mehrschichtig in der Emulsion liegen, können sich auch die entwickelten Silberkörner in Abhängigkeit von der Radioaktivität der Strahlenquelle, der Reichweite der β -Strahlen, der Dichte der Kristalle, sowie der Dauer der Exposition in mehreren Schichten übereinander anhäufen (Fig. 17). Kristalle in unmittelbarer Nähe der markierten Chromosomen haben jedoch eine höhere Wahrscheinlichkeit, von β -Partikeln getroffen zu werden, als weiter entfernt liegende (ROGERS 1967, FISCHER und WERNER 1971). Da in Chromosomenautoradiographien gleichzeitig Aktivitäten über sehr starken und sehr schwachen Strahlenquellen registriert werden müssen, sind Silberkornhäufelungen, ebenso wie Mehrfachaktivierungen, besonders über dem heterozyklischen X-Chromosom, oft nicht zu vermeiden. Auch mit dem Verschwinden latenter Bildkeime durch Reoxydation während der autoradiographischen Prozedur (fading), sowie mit dem Entstehen von Silberkörnern ohne zugrundeliegende radioaktive Zerfälle (Chemographie) muß gerechnet werden, über dessen Ausmaß bisher keine quantitativen Untersuchungen durchgeführt worden sind.

62-55: E x p o s i t i o n s z e i t

Die Wahl der Expositionszeit erfolgte bei den vorliegenden Chromosomenautoradiographien nach dem Gesichtspunkt, deutlich vom Background unterscheidbare Markierungsareale über den Chromosomen für die Auswertung im Durchlicht zu erhalten. Wir hatten keine experimentellen Untersuchungen über die Dauer der Expositionszeit bei Chromosomenautoradiographien durchgeführt. Es ist jedoch aufgrund von Literaturberichten

(ROGERS 1967, FISCHER und WERNER 1971) anzunehmen, daß eine längere Exponierung zu einer starken Koinzidenz der β -Strahlen und Häufelung der Silberkörner führen, eine kürzere Exponierung die Abgrenzung der Silberkornareale vom Background erschweren würde.

62-56: E n t w i c k l u n g

Bei der Entwicklung wächst vom latenten Bild aus ein sich unregelmäßig windender Silberkeim, der im Lichtmikroskop als solides rundes Korn imponiert. Die Größe, bis zu der ein solches Korn wachsen kann, ist begrenzt durch die Menge von Silberatomen eines Kristalls, die bei NuklearemulSIONen als mehr oder weniger konstant angesehen werden können. In Abhängigkeit von der Menge atomaren Silbers in den latenten Bildern wird jedoch die maximale Korngröße unterschiedlich rasch erreicht, sodaß bei Beendigung des Entwicklungsprozesses Körner unterschiedlicher Größe resultieren. Es können auch Nachbarkristalle von dem katalytischen Effekt eines wachsenden Silberkeimes betroffen werden, sodaß größere Silberkörner entstehen. Umgekehrt ist es möglich, daß während des Entwicklungsprozesses die latenten Bilder mit ihren Silberkörnern aus den Kristallen herausgetrennt werden, sodaß das Weiterwachsen eines Korns verhindert wird, und kleinere Körner entstehen (ROGERS 1967). Im Gegensatz zur visuellen oder apparativen Silberkornzählung werden bei der apparativen Flächenbestimmung solche Größenvariationen quantitativ miterfaßt.

62-57: Z u s a m m e n f a s s u n g

Unter Berücksichtigung aller Fehlerquellen kann aus der Silberkorndichte weder direkt auf die Menge, noch auf die exakte Lokalisation des inkorporierten Tritium-Thymidins zurückgeschlossen werden. Entsprechend den Gesetzen der Zufallsverteilung ist jedoch anzunehmen, daß die Körnerdichte am höchsten über der Strahlenquelle ist, und

symmetrisch in einigem Abstand von dieser auf Backgroundwerte abfällt (ROGERS 1967). Durch eine Analyse der Kornverteilungsdichten kann also eine Zuordnung der Silberkörner zu ihren Strahlenquellen vorgenommen werden, wenn berücksichtigt wird, daß für jedes Korn ein gewisser Umkreis angenommen werden muß, in welchem die Strahlenquelle zu suchen ist (MAURER und PRIMBSCH 1964). Die Körnerdichte stellt andererseits eine Funktion der Radioaktivität innerhalb des jeweils ausgewerteten Areal dar, sodaß man zu Aussagen über das Vorkommen der betreffenden radioaktiven Substanz in Abhängigkeit von der Objekttopographie kommt.

Setzt man voraus, daß das Ausmaß der β -Selbstabsorption, der Koinzidenz und des Fading in einem Präparat zufälligen Schwankungen unterliegt, so können diese Aussagen miteinander verglichen werden. Da es nicht möglich ist, eine statistische Analyse aller Fehler anhand der Meßergebnisse durchzuführen, ist es wichtig, eine möglichst große Zahl von Silberkornbestimmungen für das gleiche Ergebnis zur Verfügung zu haben.

Die quantitative Auswertung mehrerer Autoradiogramme, bei der es auf Vergleich untereinander ankommt, setzt voraus, daß sie unter gleichen physikalisch chemischen Bedingungen hergestellt worden sind. Um präparative Fehler zu vermeiden, sollte die autoradiographische Prozedur daher in größeren Serien, als hier erfolgt, durchgeführt werden.

62-6: DISKUSSION DER MESSMETHODIK

62-61: K ö r n e r z ä h l u n g

Die klassische Methode der quantitativen Auswertung von Autoradiographien ist die visuelle Körnerzählung. Alle bisher bekannten quantitativen Daten von Chromosomenautoradiographien basieren auf dieser Methode. Sie ist genau bei

niedrigen Körnerzahlen, für größere Reihenuntersuchungen jedoch zu langsam und mühselig und vor allem wegen des ermüdungsbedingten, nicht kontrollierbaren Zählhlers praktisch nicht anwendbar. Eine weitere Fehlerquelle bei der Körnerzählung ist die Notwendigkeit subjektiver Entscheidungen, ob beispielsweise größere, oder dunklere Körner als Mehrfachaktivierungen (Koinzidenz) gewertet und doppelt gezählt werden sollen, beziehungsweise in wie weit Konglomerate in einzelne Körner zerlegt werden können. Auch das Vorhandensein von Background Silberkörnern in einem Präparat verunsichert z. T. erheblich die Erfassung der genauen Silberkornzahlen.

Wegen dieser Einschränkungen in der Anwendbarkeit der visuellen Körnerzählung wurden mehrere Versuche unternommen, Zählhilfen zu schaffen, um meßbare Größen zu finden, die eine eindeutige Funktion der Silberkornzahl darstellen.

62-64: Mikrophotometrie

Von ROGERS A.W. (1961, 1967, 1972) und DORMER P. (1966, 1967, 1972) wurden mikrophotometrische Verfahren für eine automatische Silberkornzählung in der Einzelzellautoradiographie angegeben.

Beim Vergleich zwischen photometrischer Messung im reflektierten Licht und visueller Körnerzählung fand DORMER (1972) nur eine minimale Streuung der einzelnen Photometerwerte um die Regressionsgerade. 20 Korrelations-tests waren gewöhnlich ausreichend, um mit großer Genauigkeit eine Regression zwischen Körnerzahl und Photometerwert aufzustellen. Die Steigungen der Regressionsgeraden wurden als Umwandlungsfaktoren verwendet, durch welche die Photometerwerte dividiert wurden, um Körnerzahlen zu errechnen.

Im Gegensatz dazu erhielt HOCHERAU de REVIERS (1973) bei Verwendung der gleichen Methodik eine große Streuung der

einzelnen Meßwerte um die Regressionslinie ($r : 0,84$), welche eine Umwandlung von Photometerwerten in Körnerzahlen als nicht zweckmäßig erscheinen läßt.

Für die Auswertung von Chromosomenautoradiographien war nach unseren Erfahrungen das mikrophotometrische Verfahren nach DORMER nicht geeignet⁺⁾. Die integrierende Messung der Lichtreflexion im Auflicht scheiterte an der geringen Größe der Chromosomen und der inhomogenen Markierung von Metaphaseplatten: in Abhängigkeit von der Markierungsstärke, sowie von der Verteilung markierter Areale über die Fläche einer Metaphaseplatte entstehen wegen des starken Streulichteffekts des metallischen Silbers völlig variable Untergrundreflexionen, die nicht durch Backgroundbestimmungen an unmarkierten Arealen korrigierbar sind. Wegen dieses Streulichteffekts muß bei dem DORMER'schen Verfahren mit konstanter Meßblende gearbeitet werden, sodaß ein Vergleich der X-chromosomalen mit der autosomalen Markierung nicht durchführbar ist.

Beim Versuch einer Absorptionsmessung im Durchlicht mit einem scannenden Photometer⁺⁾ entstanden wegen der Inhomogenität der Chromosomenstrukturen innerhalb einer Metaphaseplatte, bzw. an verschiedenen Stellen der Präparate, Schwierigkeiten, die allein auf Silberkörner zurückzuführenden Absorptionswerte zu selektieren, da diese entsprechend der Dichte der zugrundeliegenden Strukturen unterschiedlich hohe Werte haben. Eine visuelle Kontrolle der gewählten Absorptionsbereiche war auf dem zur Verfügung stehenden Computerdisplay nicht möglich.

^{+) Wir danken den Firmen LEITZ, Wetzlar und ZEISS, Oberkochen, für die freundliche Ermöglichung von Probemessungen.}

62-63: Fernsehmikroskopie

Die Vorteile der Fernsehmikroskopie vor den genannten anderen Methoden bestehen in der höheren Meßgeschwindigkeit, sowie in der Erleichterung der Meßwertdiskrimination durch Kontrolle auf dem Monitor mit Hilfe der Kennungssignale. Backgroundsilberkörner, Lichtabsorption durch gefärbte Chromosomen, oder Störfaktoren der Emulsion haben ebenso wenig Einfluß auf die Meßwertgewinnung, wie Streulicht von Nachbarkörnern oder die Größe des Meßfeldes.

Die Methode ist andererseits dadurch begrenzt, daß häufig einige, etwas hellere Silberkörner nicht von dem Fernsehsystem erkannt werden können. Weiterhin ist die Entscheidung, welcher Grauwert für die Markierung einer Metaphaseplatte oder eines Chromosoms repräsentativ ist, subjektiv und daher fehlerbehaftet, sodaß nur aus einer größeren Anzahl von Messungen repräsentative Werte für die Markierung einer Population von Metaphasezellen erhalten werden kann.

Bei Silberkornclustern kann durch Bestimmung der Flächen die wahre Markierungsdichte nur dann erfaßt werden, wenn keine Überlappungen oder Silberkornhäufelungen vorliegen. Das dürfte jedoch in unseren Präparationen nicht immer der Fall gewesen sein. Zwischen sich leicht berührenden und mehrfach übereinanderliegenden Silberkörnern besteht noch ein kleiner Bereich, in dem densitometrisch eine lineare Abhängigkeit zwischen Grauwert und Silberkornmasse festgestellt werden kann (DÖRMER P. 1972). Mit unserer Methode kann eine Grauwertdiskrimination in diesem Bereich nicht durchgeführt werden. Nur die Flächen, die von den hellsten Anteilen, d.h. der Peripherie eines Kornes oder Kornclusters begrenzt sind, werden bestimmt. Wir möchten jedoch annehmen, daß Kornakkumulationen in der Höhe auch eine entsprechende Ausdehnung in der Fläche besitzen, wobei allerdings der Grad des Zusammenhangs nicht bekannt ist.

Da Silberkörner nicht transparent sind, können echte Silberkornhäufelungen mit keiner Methode sicher quantitativ erfaßt

werden, da keine Veränderung in der Absorption, Reflexion oder Dichte entstehen.

PRENSKY (1971) beschrieb eine Methode zur automatischen Körnerzählung mit Hilfe des Fernsehbildanalysators QUANTIMET (METALS RESEARCH). Bei niedrigen Silberkornzahlen (weniger als 40 Körner pro Zelle) und bei uniformer Silberkornverteilung über einer Zelle wurden sowohl mit Hilfe der apparativen Zählung, als auch der apparativen Flächen- und Durchmesserbestimmung Ergebnisse erhalten, welche sehr genau den visuell bestimmten Körnerzahlen entsprachen. Bei stärkerer Markierung erwies sich die Durchmesserbestimmung von einzelnen Silberkörnern, bzw. Silberkornclustern als genauer. Beim Vergleich apparativer und visueller Silberkornzählungen ergab sich bei 37 Zellen mit einer Körnerdichte bis zu 140 eine nahezu ideale lineare Regression mit einem Beginn in 0, einer Steigung von 1 und einem Korrelationskoeffizient von $r = 0,964$.

Die Methode von PRENSKY setzt wie fast alle bisher durchgeführten quantitativen Auswertungsmethoden von Autoradiographien voraus, daß die einzelnen Silberkörner von uniformer Größe sind. Es fehlen jedoch unseres Wissens experimentelle Untersuchungen, ob diese Voraussetzung tatsächlich zutrifft.

Untersuchungen von MERTZ (1969) über die absolute Korngröße in KODAK NTB 2 flüssiger Emulsion nach Tritiummarkierung ergaben große Standardabweichungen, die bis zu 50 % der durchschnittlichen Flächenwerte betrugen (Tab. 8).

	Fläche	Durchmesser
Durchlicht	$\pm 47 \%$	$\pm 32 \%$
Auflicht	$\pm 51 \%$	$\pm 31 \%$

Tab. 8: Standardabweichung (%) der mittlerer Fläche und des mittleren Durchmessers von Silberkörnern nach apparativer Bestimmung mit dem QUANTIMET (METALS RESEARCH) durchgeführt von MERTZ (1969).

Unter der Voraussetzung, daß die Silberkristalle in einer NuklearemulSION von konstanter Größe und Form sind, müßten die sichtbaren Unterschiede in der Korngröße durch eine unterschiedliche Lage der Körner in Bezug auf die optische Achse simuliert werden. Für unsere Versuchsbedingungen errechneten wir, daß Silberkörner in einem Tiefenbereich von höchstens $1,6 \mu$ liegen können, was zu einer Variation in der Flächenprojektion von maximal 14 % führen würde. Erfahrungsgemäß ist die Tiefenstaffelung von Silberkörnern und damit die projektionsbedingte Variabilität der Korngröße jedoch geringer (ca. 0,5 %; 7,7 %; PRSENSKY 1971, STENGEL-ROTKOWSKI et al.)

Rechnet man mit präparativen Größenschwankungen der Silberkristalle in einer Emulsion von etwa 10 % (KODAK), so bleibt nach den Messungen von MERTZ immer noch eine relativ große Schwankung der Silberkornflächen zu erklären. Wir möchten vermuten, daß Unterschiede in der Silberkorngröße, zumindest teilweise durch eine unterschiedlich große Anzahl von Silberatomen in latenten Bildern, durch eine unterschiedlich große Anzahl latenter Bilder in Kristallen, oder auch durch Nachbarschaftsaktivierungen echte Unterschiede in der Aktivierungsanreicherung der zugrundeliegenden Strukturen widerspiegeln. Sollte diese Hypothese zutreffen, so wäre die Verwendung der ursprünglichen Flächenwerte einer rechnerischen Umwandlung in Körnerzahlen vorzuziehen.

62-64: Zusammenfassung

Wir konnten zeigen, daß die relative Radioaktivität von Chromosomen durch Bestimmung von Silberkornflächen ebenso gut wie durch Bestimmung von Körnerzahlen erfaßt werden kann. Im Falle, daß Variationen in der Korngröße echte Unterschiede im radioaktiven Gehalt der chromosomalen Segmente darstellen, würden Flächenbestimmungen sogar genauere Werte als Körnerzählungen darstellen.

ROGERS (1967) zitiert eine von PELC (1959) aufgestellte Liste von Kriterien, die erfüllt sein sollten, bevor eine apparative Körnerzählung erfolgreich die allgemein akzeptierte Methode der visuellen Körnerzählung ersetzen kann:

- 1) Die Zählung von Silberkornarealen zwischen 100 und 400 μ^2 sollte nicht mehr als 30 sec. benötigen.
- 2) Der Untersucher sollte das Zählfeld sehen und Strukturen für die Messung auswählen können.
- 3) Genaue Zählungen sollten auch bei gefärbten Präparationen möglich sein.
- 4) Das Gerät sollte bis zu einem Silberkorn pro gezählte Fläche registrieren können.
- 5) Eine Genauigkeit der apparativen Körnerzählung von 5 - 10 % ist annehmbar; es ist nicht wesentlich, daß sie genauer ist. Für die Mehrzahl der Anwendungen ist ein Maß, das der Körnerzahl proportional ist, ebenso brauchbar, wie die genaue Zahl von Silberkörnern.
- 6) Das Gerät sollte in der Lage sein, Silberkörner in verschiedenen Fokusebenen zu erfassen.

ROGERS vervollständigte diese Liste mit zwei zusätzlichen Punkten:

- 7) Es sollte möglich sein, die optimale Größe und Form der auszuwertenden Flächen den markierten Strukturen anzupassen.
- 8) Das ideale Gerät zur apparativen Körnerzählung sollte einfach und strapazierfähig sein, und aus kommerziell erhältlichen Teilen konstruiert werden.

Wir konnten nachweisen, daß bei Verwendung des CLASSMAT mit Ausnahme von Punkt 6) alle Kriterien erfüllt sind, sodaß eine Auswertung von Autoradiographien mit diesem Gerät unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden kann. Wie bereits an anderer Stelle diskutiert, kommt Silberkörnern, die in

verschiedenen Fokusebenen liegen (Punkt 6) bei der Chromosomenautoradiographie eine untergeordnete Bedeutung zu.

62-7: MEßWERTVERARBEITUNG

Wie bereits erwähnt wurde, ist die Verwendung der X/Autosomen-Relation das gebräuchlichste Verfahren zur quantitativen Bestimmung der X-chromosomalen Heterozyklie. Anstelle der Autosomen könnte auch als Bezugssystem die Markierung einzelner Chromosomen verwendet werden, z.B. A₁, oder Chromosomen der B- D-, bzw. G-Gruppe (PASSARGE 1970). Wegen der Variabilität der Markierungsmuster von einzelnen Chromosomen (Asynchronie von Homologen) halten wir die gesamte autosomale Markierung für ein stabileres Bezugssystem. Die Häufigkeitsverteilung der Heterozyklienquotienten stellt ein relativ einfaches Verfahren zur Charakterisierung der X-chromosomalen Heterozyklie dar, das auch für weitere statistische verfahren geeignet scheint.

Bei dem Versuch, die vorliegenden Schwankungen in der Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie rechnerisch zu erfassen handelt es sich um rein deskriptive Statistik. Mit dem H-Test nach KRUSKAL und WALLIS ließ sich eindeutig sichern, daß Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen in der Lage und Verteilung der Meßwerte für die X-chromosomale und autosomale Markierung vorliegen. Der Eindruck, daß es sich bei den vorhandenen Unterschieden um echte alters-, bzw. funktionsabhängige Unterschiede handeln könnte, läßt sich durch diese Untersuchung nicht sichern. Es fehlen aussagefähige Tests über die Ähnlichkeit, bzw. Unähnlichkeit verschiedener Wertegruppen, die unabhängig von einer willkürlichen Vorgruppierung sind. Mit Hilfe des H-Tests läßt sich lediglich zeigen, daß die hier in Altersgruppen zusammengefaßten Individuen sich voneinander weniger stark unterscheiden als die gesamte Gruppe der Individuen. Die Homogenität der Altersgruppen konnte jedoch nicht schlüssig bewiesen werden.

Die hochsignifikanten Unterschiede zwischen Kindern und jungen Frauen sind daher nicht sicher zu bewerten, da nicht ausgeschlossen ist, daß eine andere Zusammenfassung einzelner Individuengruppen ebenfalls signifikante Unterschiede ergeben würde.

63: MOGLICHE BEDEUTUNG EINER VARIABLEN AUSPRAGUNG DER
X-CHROMOSOMALEN HETEROZYKLIE

Obwohl die vorliegende Untersuchung zufällige methodische oder funktionell bedeutungslose individuelle Variationen nicht ausschließen konnte, soll die Bedeutung eventuell vorhandener funktioneller Schwankungen in der Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie zur Diskussion gestellt werden.

63-1: HETEROZYKLIE UND INAKTIVITÄT DES X-CHROMOSOMS

Die Vermutung daß Heterozyklie ein Ausdruck genetischer Inaktivität im Sinne der LYON-Hypothese ist, beruht teilweise auf Untersuchungen an Morula- und Blastulastadien weiblicher Säuger. Da in frühembryonalen Geweben keinerlei X-chromosomale Heterozyklie nachweisbar, von einem bestimmten Zeitpunkt des Morulastadiums kurz vor der Sex-Chromatininformation jedoch immer vorhanden ist (HILL und YUNIS 1967; ISSA et al. 1969), sind offensichtlich primär beide X-Chromosomen in einer aktiven Phase, was möglicherweise dem Zweck der Geschlechtsdeterminierung gilt.

Zum anderen Teil beruht diese Vermutung auf gleichzeitigen Untersuchungen von Heterozyklie und Inaktivität, die, wie bereits erwähnt (S. 10), an weiblichen Maultierzellen durchführbar sind, da das mütterliche (Pferd) und väterliche (Esel) X-Chromosom sowohl morphologisch unterscheidbar sind, als auch elektrophoretisch unterscheidbare Varianten der G-6-PDH produzieren.

Die sehr enge Korrelation zwischen später Replikation eines der beiden elterlichen X-Chromosomen und der Aktivität der komplementären G-6-PDH führten zu dem Schluß, daß späte Replikation eines X-Chromosoms die zytologische Manifestation der genetischen Inaktivität ist.

Sollten sich tatsächlich Schwankungen im X-chromosomalen Heterozyklieverhalten sichern lassen, so würde dies entweder einem Kausalzusammenhang zwischen beiden Phänomenen widersprechen, oder aber auf die partielle, temporäre Aktivität des heterozyklischen X-Chromosoms hinweisen.

Die biochemische Bestätigung der Inaktivitätshypothese war bisher nur an Hand der autosomalen Enzyme auf dem X-Chromosom (siehe S. 8) möglich. Da die ebenfalls auf dem X-Chromosom vermuteten Sex-Faktoren (OHNO 1967) bisher biochemisch nicht identifiziert werden konnten, läßt sich zur Zeit die Vermutung nicht prüfen, ob Schwankungen in der Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie Manifestation einer temporären Aktivität des zweiten X-Chromosoms der Frau sein könnten.

In einer Untersuchung über X-gebundene Gene bei der Maus stellen auch Mc LAREN et al. (1973) die bisher noch unbeantwortete Frage, ob die Inaktivität eines X-Chromosoms beim weiblichen Säuger vollständig oder partiell ist und ob sie im späteren Leben partiell rückgängig gemacht wird. Es muß jedoch bedacht werden, daß zwischen der hier untersuchten DNS-Syntheseaktivität, die lediglich der eigenen Selbsterhaltung dient, und eventuell vorhandenen X-chromosomalen Synthesevorgängen zur Genexpression bisher kein echter Zusammenhang bekannt ist. Es ist daher nicht möglich, von einer variablen Ausprägung der Heterozyklie unmittelbar auf eine modifizierte Inaktivität zu schließen. Ein morphologischer Nachweis der Genexpression ist bis jetzt an menschlichen Chromosomen noch nicht gelungen.

63-2: HINWEISE FÜR EINE HORMONELLE STIMULIERUNG
X-CHROMOSOMALER SYNTHESEVORGÄNGE

Unabhängig von unseren Befunden gibt es Hinweise darauf, daß das inaktivierte X-Chromosom durch Hormone, speziell durch Oestrogene aktiviert werden kann (GOLDSTEIN 1972, MURSE und JENKINS 1973). Ursache für diese Vermutung sind zahlreiche Literaturberichte über eine hormonelle Beeinflussung des X-chromosomalen Kondensationszustands in Interphasekernen der Mundschleimhaut (Sex-Chromatin): es wird von Schwankungen in der Sex-Chromatin-Frequenz berichtet, die mit unterschiedlichem Lebensalter, bzw. unterschiedlichen hormonellen Zuständen der untersuchten Individuen gekoppelt sind (Zusammenfassung bei HAGY et al. 1972): Weibliche Neugeborene haben in den ersten 3 Lebenstagen eine erniedrigte Sex-Chromatin-Frequenz (SMITH et al. 1962; TAYLOR 1963; FRASIER 1964; HSU 1967; CURTIS 1969), ebenso Frauen über 60 Jahre (SILVESTRI 1957). - Variationen in der Sex-Chromatin-Frequenz während besonderer Abschnitte des menstruellen Zyklus wurden von mehreren Autoren berichtet (BLANCO del CAMPO 1965; DOKUMOV und SPASOV 1965; RIESENBERG et al. 1966, 1967; SCHMIDT et al. 1966; LEVI und CAREL 1968; HAGY et al. 1972), wobei dem Progesteron eine entspiralisierende Wirkung auf das X-Chromosom (niedrige Sex-Chromatin-Frequenz) zugeschrieben wird. Von anderen Autoren wurden diese Befunde nicht bestätigt (BRAINERED et al. 1965; DOLAN 1968). Für diese Befunde spricht jedoch, daß auch schwangere Frauen sehr stark erniedrigte Sex-Chromatinwerte im Vergleich zu normal menstruierenden Frauen haben (TOWNSEND et al. 1970). - Signifikant erniedrigte Sex-Chromatin-Frequenzen wurden ferner bei Hypothyreose (HOEFNAGEL und WURSTER 1971), Nebennierenrindenüberfunktion (GAREIS et al. 1971), sowie unter Prednisontherapie (SHETTY 1968), nach schweren Verbrennungen (erhöhte Nebennierenrindenaktivität; WESTE et al. 1967), beim Mammacarzinom (KIMEL V. 1957; JAMES 1966; STANLEY et al. 1966; WACKER und MILES 1966; SHIRLEY 1967) und nach Therapie mit Testosteron bzw. Progesteron (DOKUMOV und SPASOV 1967) gefunden. -

Auch schizophrene Frauen sollen eine reduzierte Sex-Chromatin-Frequenz aufweisen (PLATT 1966).

Auf Grund dieser Befunde liegt die Vermutung nahe, daß die beobachteten Schwankungen in der Sex-Chromatin-Frequenz in Mundschleimhaut auf eine hormonelle Basis zurückgeführt werden können (MILLER und WARBURTON 1968).

Für Uterusgewebe ist darüberhinaus auch eine Stimulierung des X-chromosomal gebundenen Enzyms G-6-PDH durch Östrogene (SCOTT und LISI 1960; BARKER und WARREN 1966; LERNER et al. 1966; ECKSTEIN und VILLEN 1966; SMITH und GORSKI 1967), sowie eine Östrogen bedingte Beeinflussung der gesamten DNS-(HA-MILTON 1968) und DNS-Synthese (YOSHIM und PEPE 1971; KAYE et al. 1972) nachgewiesen worden.

Über einen etwaigen Einfluß von Hormonen auf den Zeitpunkt der X-chromosomalen Replikation liegen unseres Wissens bisher keine Literaturberichte vor. Auch diese vorliegende Untersuchung war nicht auf eine Beurteilung der Heterozyklie in Abhängigkeit von hormonellen Zuständen ausgerichtet. Die im allgemeinen höheren Werte der Heterozyklie bei jungen Frauen gegenüber Kindern und gegenüber der 54 und 58-jährigen Probandin lassen jedoch die Deutung zu, daß ein hoher Plasmaspiegel an Sexualhormonen eine starke Ausprägung der Heterozyklie zur Folge hat.

Sollte sich durch weitere Untersuchungen eine hormonelle Beeinflussung der X-chromosomalen Heterozyklie nachweisen lassen, so wäre dies als Hinweis auf eine mögliche Bedeutung des zweiten, sogenannten inaktiven X-Chromosoms im Stoffwechsel der Frau zu werten, obwohl der Zusammenhang zwischen modifizierter Heterozyklie und partieller Genaktivierung ungeklärt ist.

7: Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurde erstmals mit Hilfe einer optisch-elektronischen Meßeinheit (LEITZ-CLASSIMAT) eine quantitative Untersuchung Tritium-Thymidin markierter Mitosechromosomen menschlicher Lymphocyten durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial stammte von 4 Kindern im Alter zwischen 8 und 30 Monaten, 6 Frauen zwischen 20 und 26 Jahren, sowie 5 Frauen im Alter von 50 bis 58 Jahren.

Gegenstand der Untersuchung war das spät replizierende heterozyklische X-Chromosom. Es wurde eine Variabilität in der Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie beobachtet, die es nicht erlaubte, Normalkriterien aufzustellen. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß der weibliche Hormonstatus, welcher junge Frauen von Kindern und älteren Frauen unterscheidet, für eine stärkere Ausprägung der X-chromosomalen Heterozyklie verantwortlich sein könnte. Das Vorhandensein zufälliger methodischer oder individueller Variationen in der Stärke der X-chromosomalen Heterozyklie konnte jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Arbeit enthält eine ausführliche Beschreibung des Verfahrens zur optisch-elektronischen Bildanalyse, sowie eine grundlegende Diskussion über Möglichkeiten und Grenzen der quantitativen Chromosomenautoradiographie.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) ATKINS L.; GUSTAVSON K.H.: The pattern of DNA-synthesis in human chromosomes in cells with an sex chromosome constitution. *Hereditas* 51, 135-145, 1964.
- 2) BADER S.; MILLER O.J.; MUKHERJEE B.B.: Observations on chromosome duplication in cultured human leukocytes. *Exp. Cell Res.* 31, 100-112, 1963.
- 3) BARKER K.L.; WARREN J.C.: Estrogen control of carbohydrate metabolism in the rat uterus: pathways of glucose metabolism. *Endocrinology* 78, 1205-1212, 1966.
- 4) BARR M.L.; BERTRAM E.G.: A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163, 676-677, 1949.
- 5) BEUTLER E.; YEH M.; FAIRBANKS V.F.: The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity; studies using the gene for G-6-PDH-deficiency as a marker. *Proc.Nat.Acad. Sci.* 48, 9-16, 1962.
- 6) BEUTLER E.; BALUDA M.C.: The separation of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes from the blood of heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 1, 189, 1964.
- 7) BIANCHI N.O.; de BIANCHI M.A.: DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures. *Chromosoma, Berl.* 17, 237-70, 1965.
- 8) BLANCO del CAMPO M.S.; RAMIREZ O.E.: Fluctuations of the sex chromatin during the menstrual cycle. *Acta Cytol* 9, 251-256, 1965.

- 9) BOSTOCK C.J.; PRESCOTT D.M.: Shift in buoyant density of DNA during the synthetic period and its relation to euchromatin and heterochromatin in mammalian cells. *J. Molec. Biol.* 60: 151-162, 1971.
- 10) BRAINERD T.; MERCER C.; MILES C.P.: Absence of correlation between sex chromatin incidence and menstrual cycle. *Acta Cytol.* 9, 440-441, 1965.
- 11) BUCHNER T.; WILKENS A.; PFEIFFER R.A.: Autoradiographisches Markierungsmuster der Chromosomen 1,2,3,4,5,13-15, 16 und Grad der Ubereinstimmung der Homologen nach Einbau von H_3 - Thymidin während der späten S-Phase. Quantitative Untersuchung an Zellen der Blutkultur. *Klin. Wschr.* 4, 187-194, 1968.
- 12) CALDERON D.; SCHNEDL W.: A comparison between Quinacrine fluorescence banding and 3H -Thymidine incorporation patterns in human chromosomes. *Humangenetik* 18, 63-71, 1973.
- 13) CARO L.G.; SCHNIES M.: Tritium and phosphorus-32 in high resolution autoradiography. *Science* 149, 60, 1965.
- 14) COHEN F.; ZUELZER W.W.; EVANS M.M.: Fluorescent antibody technique and the LYON hypothesis. *Lancet* 1, 1392, 1964.
- 15) COHEN M.M.; RATTAZZI M.C.: Cytological and biochemical correlation of late X-chromosome replication and gene inactivation in the mule. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 68, 544-548, 1971.
- 16) COMINGS D.E.: The duration of replication of the inactive X-chromosome in humans based on the persistence of the heterochromatic sex chromatin body during DNA synthesis. *Cytogenetics* 6, 20-37, 1967.

- 17) COMINGS D.L.; KAKUFUDA T.: Initiation of DNA replication at the nuclear membrane in human cells. J. Mol. Biol. 33, 225-229, 1968.
- 18) COMINGS D.L.: The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. Am J. hum. Genet. 20, 440-460, 1968.
- 19) COMINGS D.E.; OKADA T.A.: Whole-mount electron microscopy of the centromere region of metacentric and telocentric mammalian chromosomes. Cytogenetics 9, 436-439, 1970.
- 20) COMINGS D.E.: Replicative heterogeneity of mammalian DNA. Exp. Cell Res. 71, 106-113, 1972.
- 21) CURTIS D.J.: Sex chromatin frequency in buccal mucosal tissue: the normal female population. Cytogenetics 8, 20-29, 1969.
- 22) DAVIDSON R.G.; NIOWSKY H.M.; CHILDS B.: Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50, 481-485, 1963.
- 23) DEYS B.F.: Human phosphoglycerate kinase and inactivation of the X-chromosome. Science 175, 1002-1003, 1972.
- 24) DORMER P.; BRINKMANN W.; STIEBER A.; STICH W.: Automatische Silberkornzählung in der Einzelzell-Autoradiographie. Klin. Wschr. 44, 477-482, 1966.
- 25) DORMER P.: Photometric methods in quantitative autoradiography. in: Microautoradiography and electron probe analysis. ed. LÜTTGE U. Springer Verl. Berl., Heidelberg, New York, 1972, S. 7-48.

- 26) DORNER P.: Auflichtphotometrische Untersuchungen zur Größe der Koinzidenz in der Autoradiographie mit Tritium. *Histochemie* 8, 1-8, 1967.
- 27) DOKUMOV S.J.; SPASOV S.A.: Sex chromatin pattern and menstrual cycle. *Acta Cytol.* 12, 131-136, 1965.
- 28) DOKUMOV S.J.; SPASOV S.A.: Sex chromatin and sex hormones. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 97, 714-718, 1967.
- 29) DOLAN B.E.: Sex chromatin incidence and the human menstrual cycle. *Acta Cytol.* 12, 128-130, 1968.
- 30) DUCOS J.; MARTIN Y.; SANGER R.; RACE R.R.: Xg and X-chromosome inactivation. *Lancet* 2, 219, 1971.
- 31) Du PRAW E.J.: Cell and molecular biology. Acad. Press New York, London, 1969, S. 518.
- 32) ECKSTEIN B.; VILLEE C.A.: Effect of estradiol on enzymes of carbohydrate metabolism in rat uterus. *Endocrinology* 78, 409-411, 1966.
- 33) ELLISON J.R.; BARR H.J.: Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high A: T-content in *Samoa leonensis*. *Chromosoma* 36, 375-391, 1972.
- 34) EMERY A.E.H.; KING B.: Pregnancy and serum-creatinine-kinase levels in potential carriers of DUCHENNE X-linked muscular dystrophy. *Lancet* 1, 1013, 1971.
- 35) EPSTEIN C.J.: Mammalian oocytes: X-chromosome activity. *Science* 163, 1078-1079, 1969.
- 36) FIALKOW P.J.: X-chromosome inactivation and the Xg-locus. *Amer. J. Hum. Genet.* 22, 460-463, 1970.

- 37) FISCHER H.A.; WERNER G.: Autoradiographie. Walter de Gruyter & Co. Berlin, 1971.
- 38) FITZGERALS P.H.: Autoradiography of terminal DNA replication of the G-group autosomes of man: homologous asynchrony of the late replicating G-pair. Am. J. Human. Genet. 23, 390-403, 1971.
- 39) FLAMM W.G.; BERNHEIM J.N.; BRUBAKER P.E.: Density gradient analysis of newly replicated DNA from synchronized mouse lymphoma cells. Exp. Cell Res. 64, 97-104, 1971.
- 40) FRASIER S.D.; CRUDO F.S.; FARRELL F.J.: Buccal smears in the newborn female. J. Pediat. 65, 222-225, 1964.
- 41) FUDENBURG H.H.; HIRSCHHORN K.: Agammaglobulinaemia: the fundamental defect. Science 145, 611-12, 1964.
- 42) GAREIS F.J.; ASPER A.C.: Low X-chromatin frequency in untreated congenital adrenal hyperplasia. Lancet 2, 373-374, 1971.
- 43) GAVOSTO F.; PEGORARO L.; MASERA P.; ROVERA G.: Late DNA replication pattern in human haemopoietic cells. A comparative investigation using a high resolution quantitative autoradiography. Exp. Cell Res. 49, 340-58, 1968.
- 44) GERMAN J.L.: III. DNA synthesis in human chromosomes. Trans. New York Acad. Sci. 24, 395-407, 1962.
- 45) GEY W.: Autoradiographie an menschlichen Chromosomen mit ^3H -Thymidin. in SCHWARZACHER H.G.; WOLF U., Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 1970. S. 67-83.

- 46) GIANNELLI F.: The pattern of X-chromosome desoxyribonucleic acid synthesis in two women with abnormal sex-chromosome complement. *Lancet* 1, 863-865, 1963.
- 47) GIANNELLI F.: Human chromosomes DNA synthesis. Monographs in human genetics. S. KARGER, Basel, München, New York, 1970.
- 48) GIANNELLI F.; HAMERTON J.L.: Non random late replication in mules and hinnies. *Nature* 232, 315-320, 1971.
- 49) GILBERT C.W.; MULDAL S.; LAJTHA L.G.; ROWLEY J.: Time sequence of human chromosome duplication. *Nature* 195, 869-873, 1962.
- 50) GILBERT C.W.; MULDAL S.; LAJTHA L.G.: Rate of chromosome duplication at the end of the deoxyribonucleic acid synthetic period in human blood cells. *Nature* 208, 159-161, 1965.
- 51) GOLDSTEIN A.J.: Determination of which enzymes are programmed on the X-chromosome. *Lancet* 2, 713, 1972.
- 52) GORMAN J.G.; DIERCK J.; TREACY A.M.; GORMAN A.: The application of Xg^a antiserum to the question of red cell mosaicism in female heterozygotes. *J.Lab.Clin.Med.* 61, 642-649, 1963.
- 53) GRAY J.E.: Lyonisation of the X-chromosome. *Lancet* 2, 1070, 1963.
- 54) GRUMBACH M.M.; MORISHIMA A.; TAYLOR J.L.: Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization. *Proc.Nat. Acad. Sci.* 49, 581-589, 1963.

- 55) GRZESCHIK K.H.; GRZESCHIK A.M.; BANHOFF S.; ROMEO G.;
SINISCALCO M.; van SOMEREN H.; KHAN P.M.; WESTERVELD A.;
BOOTSMA D.: X-linkage of human α -galactosidase.
Nature New Biol. 240, 48-50, 1972.
- 56) HAGY G.W.; BRODERICK M.M.: Variations of sex chromatin
in human oral mucosa during the menstrual cycle. Ac
a Cytol. 16, 314-322, 1972.
- 57) HAMERTON J.L.; GIANNELLI F.; COLLINS F.; HALLETT J.;
FRYER A.; Mc GUIRE V.M.; SHORT R.V.: Non random X-inacti-
vation in the female mule. Nature 222, 1277-1278, 1969.
- 58) HAMERTON J.L.; RICHARDSON B.J.; GEE P.A.; ALLEN W.R.;
SHORT R.V.: Non- random X-chromosome expression in
female mules and hinnies. Nature 232, 312-315, 1971.
- 59) HAMILTON F.H.; WIDNELL C.C.; TATA J.R.: Synthesis of RKA
during early estrogen action. J. Biol. Chem. 243, 408-417,
1968.
- 60) HAMILTON T.H.: Control by estrogen of genetic transscription
and translation. Science 161, 649-661, 1968.
- 61) HENDERSON J.F.; KELLEY W.N.; ROSENBLUM F.M.; SEEGMILLER
J.E.: Inheritance of purine phosphoribosyltransferase
in man. Am. J. Hum. Genet. 21, 61-71, 1969.
- 62) HILL R.N.; YUNIS J.J.: Mammalian X-chromosomes: change in
pattern of DNA replication during embryogenesis. Science
155, 1120-1121, 1967.
- 63) HIRSCHHORN R.; DECSY M.I.; TROLL W.: The effect of PHA
stimulation of human peripheral blood lymphocytes upon
cellular content of euchromatin and heterochromatin. Cell
Immunol. 2, 696-702, 1971.

- 64) HOCHERAT de REVIERS M.T.: Die quantitative Autoradiographie in der Histologie: Einfluß bestimmter technischer Faktoren und Anwendungsbeispiele. *LEITZ-Nitt. Wiss. Techn.* 5, 233-239, 1973.
- 65) HOEFNAGEL D.; WURSTER D.: Low X-chromatin frequency in a case of hypothyreoidism. *Lancet* 2, 978, 1971.
- 66) HSU L.Y.F.; KLINGER H.P.; WEISS J.: Influence of nuclear selection criteria on sex chromatin frequency in oral mucosal cells of newborn females. *Cytogenetics* 6, 371-382, 1967.
- 67) HSU T.C.; LOCKMART L.H.: The beginning and the terminal states of DNA synthesis of human cells with an XXXXY constitution. *Hereditas* 52, 320-324, 1964.
- 68) HSU T.C.; ARRIGHT F.E.; SAUNDERS G.L.: Compositional heterogeneity of human heterochromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1464-1466, 1972.
- 69) HUBERMAN J.A.; RIGGS A.D.: On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Molec. Biol.* 32, 327-341, 1968.
- 70) ISSA M.; BLANK C.E.; ATHERTON G.W.: The temporal appearance of sex chromatin and of the late replicating X-chromosome in blastocysts of the domestic rabbit. *Cytogenetics* 8, 219-237, 1969.
- 71) JACOB F.; BRENNER S.; CUZIN F.: On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 329-348, 1963.
- 72) JAMES J.: Sex chromatin in breast carcinoma. *Lancet* 1, 924, 1966.

- 73) KAMIN G.; KLUGE N.; MULLER W.; RZYZNIK J.: LEITZ-CLASSIMAT. Ein Instrument zur optischen Bilddatenerfassung. LEITZ-Mitt. Wiss. Techn. Suppl. 1/1, 1-25, 1970.
- 74) KAYE A.M.; SHERATZKY D.; LINDER H.R.: Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. Biochim Biophys. Acta 261, 475-478, 1972.
- 75) KIAN M.; WESTERVED A.; GRZESCHIK K.H.; DEYS B.F.; GARSON O.N.; SINISCALCO M. X-linkage of human phosphoglycerate kinase, confirmed in man-mouse and man-chinese hamster somatic cell hybrids. Amer. J. Hum. Genet. 23, 614-623, 1971.
- 76) KIKUCHI Y.; SANDBERG A.A.: Chronology and pattern of human chromosome replication. I. Blood leucocytes of normal subjects. J. Nat. Canc. Inst. 32, 1109-1143, 1964.
- 77) KIKUCHI Y.; SANDBERG A.A.: Chronology and pattern of human chromosome replication. II. Autoradiographic behavior of various Y-and X-chromosomes. J.Nat.Canc.Inst. 34, 795-813, 1965.
- 78) KIMEL V.: Clinical-cytological correlations of mammary carcinoma based upon sex chromatin counts. - A preliminary study. Cancer 10, 922-927, 1957.
- 79) KINT J.A.: FABRY's disease: Alpha-galactosidase deficiency. Science 167, 1268, 1970.
- 80) KIRKMAN H.A.; HENDRICKSON E.M.: Sex-linked electrophoretic difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase. Amer. J. Hum.Genet. 15, 241-253, 1963.
- 81) KORNFELD S.; KORNFELD R.: Solubilization and partial characterization of a phytohemagglutininreceptor site from human erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Su USA 63, 1439, 1969

- 82) LERNER L.J.; HILF R.; TURKHEIMER R.; MICHEL J.; ENGELS S.L.: Effects of hormone antagonists on morphological and biochemical changes induced by hormonal steroids in the immature rat uterus. *Endocrinology* 78, 111-124, 1966.
- 83) LEVIJ I.S.; CAREL R.: Variations in the incidence of sex chromatin - a reappraisal. *Acta Cytol.* 12, 352-356, 1968.
- 84) LIMA de FARIA A.; REITALU J.; BERMAN S.: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of man. *Hereditas* 47, 695-704, 1961.
- 85) LINDSTEN J.; BERGSTRAND C.G.; TILLINGER K.G.; SCHWARZACHER H.G.; TIEPOLO L.; MULDAL S.; KOKIETT B.: A clinical and a cytogenetical study of three patients with male phenotype and apparent XX sex chromosome constitution. *Acta endocrinol. Kbh.* 52, 91-112, 1966.
- 86) LIPSETT N.B.: Factors influencing the rate of metabolism of steroid hormones in man. *Ann. New York Acad. Sci.* 179, 442-449, 1972.
- 87) LOEB L.A.; AGARWAL S.S.: DNA polymerase. Correlation with DNA replication during transformation of human lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 66, 299-304, 1971.
- 88) LYON M.F.: Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372-373, 1961.
- 89) LYON M.F.: Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 14, 135-148, 1962.
- 90) LYON M.F.: Attempts to test the inactive -X theory of dosage compensation in mammals. *Genetic Res.* 4, 93-103, 1963.

- 91) LYON M.F.: Sex-chromatin and gene action in the X-chromosome of mammals. in: The sex chromatin. ed. MOORE K.L. W.B. SAUNDERS Comp. Philadelphia, London, 1966. S. 370-387.
- 92) Mac DIARMID W.D.; LEE G.R.; CARTWRIGHTER G.E.; WINTROBE M.N.: X-inactivation in an unusual X-linked anaemia and the Xg^a blood group. Clin. Res. 15, 132, 1967.
- 93) Mac KUSICK V.A.: The X-chromosome of man. Amer. Inst. Biol. Sci. (Wash.) 1964.
- 94) MACMANUS J.P.; WHITFIELD J.F.: Stimulation of DNA synthesis and mitotic activity of thymic lymphocytes by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. Exptl. Cell Res. 58, 188-191, 1969.
- 95) MANN J.D.; CAMAN A.; GELB A.G.; FISHER N.; HAMPER J.; TIPPETT P.; SANGER R.; RACE R.R.: A sex-linked blood group. Lancet 1, 8, 1962.
- 96) MARKS P.A.; GROSS R.T.: Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Evidence of differences between Negroes and Caucasians with respect to this genetically determined trait. J. Clin. Invest. 38, 2253, 1959.
- 97) MAURER W. PRIMBSCH E.: Größe der β -Selbstabsorption in der ³H-Autoradiographie. Exp. Cell Res. 33, 8-18, 1964
- 98) Mc LAREN A.; GAULD I.K.; BOWMAN P.: Comparison between mice chimaeric and heterozygous for the X-linked gene tabby. Nature 241, 180-183, 1973.
- 99) MERTZ M.: Bestimmung der Silberkorngröße in Autoradiogrammen bei Auflicht und Durchlicht. Histochemie 17, 128-137, 1969.

- 100) NIGEON B.R.; der KALOUSTIAN V.M.; NYHAN W.L.; YOUNG W.; CHILDS B.: X-linked hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency: Heterozygote has two clonal populations. *Science* 160, 425-27, 1968.
- 101) MILLER O.J.; WARBURTON D.: The control of sex chromatin I. The significance of the distribution of sex chromatin counts in individuals with three or more X-chromosomes. *Cytogenetics* 7, 58-77, 1968.
- 102) MOORHEAD P.S.; NOWELL P.C.; MELLMAN W.J.; BATTIPS D.M.; HUNGERFORD D.A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20, 613-616, 1960.
- 103) MOORHEAD P.S.; DEFENDI V.: Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. *J. Cell Biol.* 16, 202-209, 1963.
- 104) MORISHIMA A.; GRUMBACH M.M.; TAYLOR J.H.: Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 48, 756-763, 1962.
- 105) MUKHERJEE B.B.; SINHA A.K.: Single-active-X hypothesis: cytological evidence for random inactivation of X-chromosomes in a female mule complement. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 51, 252-259, 1964.
- 106) MULDAL S.; GILBERT C.W.; LAJTHA L.G. LINDSTEN J.; ROWLEY J.; FRACCARO M.: Tritiated thymidine incorporation in an isochromosome for the long arm of the X-chromosome in man. *Lancet* 1, 861-863, 1963.
- 107) MULLER H.J.: Evidence of the precision of genetic adaptation. *Harvey lectures* 43, 165, 1947.

- 108) NURSE G.T.; JENKINS T.: G-6-PD phenotypes and X-chromosome inactivation. *Lancet* 1, 99-100, 1973.
- 109) KYHAN W.L.; PESEK J.; SWEETMAN L.; CARPENTER D.G.; CARTER H.: Genetics of an X-linked disorder of uric acid metabolism and cerebral function. *Pediat. Res.* 1, 5, 1967.
- 110) OCKEY C.H.: Human chromosome identification and the pattern of DNA replication in fibroblasts from an XXY male. A quantitative autoradiographic study of early and late synthesis. *Cytogenetics* 8, 272-95, 1969.
- 111) OHNO S.; KAPLAN W.D.; KINOSITA R.: X-chromosome behaviour in germ and somatic cells of *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell Res.* 22, 535-544, 1961.
- 112) OHNO S.: Sex chromosomes and sex-linked genes. *Monographs on Endocrinology*. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- 113) PACHMANN U.; RIGLER R.: Quantum yield of acridines interacting with DNA of defined base sequence. *Exp. Cell Res.* 72, 602-608, 1972.
- 114) PASSARGE E.: Der Karyotyp des Menschen. Identifizierung von Mitosechromosomen und Auswertung cytogenetischer Befunde in: SCHWARZACHER H.G.; WOLF U. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 1970, S. 86.
- 115) PEARSON C.M.; FOWLER W.H.; WRIGHT S.W.: X-chromosome mosaicism in females with muscular dystrophy. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50, 24-31, 1963.

- 116) PERRY R.P.: Quantitative autoradiography. in: PRESCOTT D.M.: Methods in cell physiology. Acad. Press. New York. 1964. Vol. I, S. 305.
- 117) PETERSEN A.M.: DNA synthesis and chromosomal asynchrony. J. Cell Biol. 23, 651-654, 1964.
- 118) PFEIFFER R.A.; BUCHNER T. SCHARFENBERG, W.; SCHLUTER I.: Morphologie und DNS-Synthese eines ringförmigen Geschlechtschromosoms bei einem Kind mit TURNER'Syndrom. Klin. Wschr. 43, 521-528, 1965.
- 119) PICARD J.-Y.; van CONG N.; BILLARDON C.; de KACUEL C.; FEINGOLD J.; FREZAL J.; DEBRE M.R.: Confirmation de la localisation de la phosphoglycerat-kinase sur le chromosome X par la methode d'hybridisation cellulaire homme-souris. CR Acad. SC, Paris 273, 95-96, 1971.
- 120) PLATT L.J.; KALLIN E.W.: Sex chromatin frequency. J. Amer. Med. Ass. 187, 182-186, 1964.
- 121) POTTER R.L.; NYGAARD O.F.: The conversion of thymidine to thymine nucleosides and deoxyribonucleic acid in vivo. J. biol. Chem. 238, 2150-2155, 1963.
- 122) PRENSKY W.: Automated image analysis in autoradiography. Exp. Cell Res. 68, 388-394, 1971.
- 123) PROKOFIEWA-BELGOVSKAYA A.A.; SLEZINGER S.J.: Replication of human chromosomes in primary cultures of embryonic fibroblasts. II. Interchromosomal asynchrony of DNA replication. Cytogenetics 7, 347-360, 1968.
- 124) RATTAZZI M.C.; COHEN M.M.: Further proof of genetic inactivation of the X-chromosome in the female mule. Nature 237, 393-396, 1972.

- 125) RAY M.; GLE P.A.; RICHARDSON B.J.; HAMERTON J.L.:
Late replication of X-chromosomes and G-6-PD expression
in a female mule. *Nature* 237, 396-397, 1972.
- 126) REED T.E.; SIMPSON N.E.; CHOWN B.: The Lyon hypothesis.
Lancet 2, 467, 1963.
- 127) RIESENBERG D.E.; van PEENEN H.J.; SCHMIDT N.; MILLER
W.V.; LUCAS F.V.: Evidence for activation of the second
X-chromosome in females. *Fed. Proc.* 25, 234, 1966.
- 128) RIESENBERG D.E.; van PEENEN H.J.; MILLER W.V.; SCHMIDT
N.E.; LUCAS F.V.: Further evidence for cyclic activation
of the heterochromatic X-chromosome in human females.
Amer. J. Obstet. Gynec. 97, 91-93, 1967.
- 129) ROGERS A.W.: A simple photometric device for the
quantitation of silver grains in autoradiographs of
tissue sections. *Exp. Cell Res.* 24, 228-240, 1961.
- 130) ROGERS A.W.: *Techniques of autoradiography*. Elsevier
Publishing Comp. Amsterdam, London, New York 1967.
- 131) ROGERS J.C.; BOLDT D.; KORKFELD S.; SKINNER A.;
VALERI A.: Excretion of deoxyribonucleic acid by
lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or
antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1685-1689, 1972.
- 132) ROMLO G.; NIGEON B.R.: Genetic inactivation of the
a-galactosidase locus in carriers of FABRY's disease.
Science 170, 180-181, 1971.
- 133) ROSENBLUM F.M.; KELLEY W.N.; HENDERSON J.F.; SEEG-
MILLER J.E.: LYON hypothesis and X-linked disease.
Lancet 2, 305-306, 1967.

- 134) ROWINSKI J.; ADAMSKI M.; SAWICKI W.: Quantitative autoradiography of ^3H -thymidine-labelled nuclei: Reduction of grain count caused by washing in water. *Histochemie* 28, 250-255, 1971.
- 135) ROWLEY J.; MULDAL S.; GILBERT C.W.; LASTHA L.G.; LINDSTEN J.; FRACCARO M.; KAUSCHER K.: Synthesis of DNA on X-chromosomes of an XXXXY male. *Nature* 197, 251-252, 1963.
- 136) ROWLEY J.; MULDAL S.; LINDSTEN J.; GILBERT C.W.: ^3H -thymidine uptake by a ring-X-chromosome in a human female. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 51, 779-786, 1964.
- 137) SACIS L.: Statistische Auswertungsmethoden. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
- 138) SALZMANN J.; de MARS M.; MUKAI P.: Single allele expression at an X-linked hyperuricemia locus in heterozygous human cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 60, 545-552, 1968.
- 139) SCHARTENBERG W.: Autoradiographische Untersuchungen über die Reduplikation normaler und abnormer X-Chromosomen beim Menschen. Med. Dissertation, Münster 1967.
- 140) SCHMIDT M.E.; MILLER W.V.; van PEENEN H.J.; LUCAS F.V.: Changes in sex chromatin pattern during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynec.* 94, 422-424, 1966.
- 141) SCHMID, W.: DNA replication patterns of human chromosomes. *Cytogenetics* 2, 175-193, 1963.

- 142) SCHILD W.: Autoradiography of human chromosomes.
in: Human chromosome methodology. ed. YUNIS J.J.
Acad. Press, New York, 1965. S. 91-110.
- 143) SCOTT D.B.; LISI A.G.: Changes in enzymes of the
uterus of the ovariectomized rat after treatment with
estradiol. Biochem. J. 77, 52-63, 1960.
- 144) SEEGMILLER J.D.; ROSENBLUM F.M.; KELLEY W.N.:
enzyme defect associated with sex-linked human neuro-
logical disorder and excessive purine synthesis.
science 155, 1682-84, 1967.
- 145) SHETTY K.T.; SHARMA N.L.; WAHAL K.M.: Sex chromatin in
prednisone-treated children. Brit. med. J. II, 84-86,
1966.
- 146) SHIRLEY R.: The nuclear sex of breast cancer.
Surg. Gynec. Obstet. 125, 737-40, 1967.
- 147) SILVESTRI G.: Osservazioni sulle cellule a "chromatini
positiva" e a "chromatina negativa" in cute umana
dell'eta senile. Arch. Ital. Derm. Vener. 28, 341-
347, 1957.
- 148) SMITH D.W.; MARDEN P.M.; Mc DONALD M.J.; SPECKHARD N.:
Lower incidence of sex chromatin in buccal smears of
newborn females. Pediatrics 30: 707-711, 1962.
- 149) SMITH D.E.; GORSKI J.: The effect of estrogen on the
activity of glucose phosphorylating enzymes in rat
uterus. Life Sci 6, 1263-1268, 1967.
- 150) SMITH J.W.; STEINER A.L.; NEWBERRY W.M.; PARKER C.W.:
Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate in human lympho-
cytes. Alterations after PHA stimulation. J. Clin. Invest.
50, 432-41, 1971.

- 151) STANLEY M.A.; BIGHAM D.A.; COX R.J.; KIRKLAND J.A.; OPIT L.J.: Sex chromatin anomalies in female patients with breast carcinoma. *Lancet* 1, 690-691, 1966.
- 152) STENGEL-RUTKOWSKI S.; GUNDLACH H.; ZANG K.D.: Quantitative electronic analysis of chromosome autoradiographs using a television image analysing computer, (in Vorbereitung).
- 153) SWEETLEY C.C.; KLIOWSKY B.: FABRY's disease: Classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J. Biol. Chem.* 238, 3148, 1963.
- 154) TAYLOR J.H.; WOODS P.S.; HUGHES W.L.: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc.Nat.Acad.Sci USA*, 43, 122-128, 1957.
- 155) TAYLOR A.J.: Sex-chromatin in the newborn. *Lancet* 1, 912-914, 1963.
- 156) TOBIA A.M.; SCHILDKRAUT C.L.; MAIO J.: Deoxyribonucleic acid replication in synchronized cultured mammalian cells. I. Time of synthesis of molecules of different average guanine + cytosine content. *J. Mol. Biol.* 54, 499-515, 1970.
- 157) TOWNSEND J.F.; CASE M.S.; LUCAS F.: The sex chromatin count in pregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 108, 585-587, 1970.
- 158) VALENTINE W.N.; HSIEH H.S. PAGLIA D.E.; ANDERSON H.M.; BAUGHAN M.A.; JAFFEE R.; GARSON O.M.: Hereditary hemolytic anaemia: Association with phosphoglycerate kinase deficiency in erythrocytes and leukocytes. *New Engl. J. Med.* 280, 528, 1969.

- 159) WACKER B.; MILES C.P.: Sex chromatin incidence and prognosis in breast cancer. *Cancer* 19, 1651-1654, 1966.
- 160) WEISBLUM B.; HASETH P.L. de: Quinacrine, a chromo-
some stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate
rich regions in DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*,
69, 629-632, 1972.
- 161) WENNSTRÖM J.; de la CHAPELLE A.: Autoradiographic
studies of chromosomal DNA synthesis in two human
males with female karyotypes. *Hereditas*, Lund, 57,
411-420, 1967.
- 162) WESTE S.M.; BARNETT J.S.; GARSON O.M.; BAIKIE A.G.:
Variations in the frequency and form of sex chromatin
in females with burns. *Lancet* 1, 745-746, 1967.
- 163) YOCHIM J.M.; PEPE G.J.: Effect of ovarian steroids
on nucleic acids, protein and G-6-PD activity in
endometrium of the rat; a metabolic role for pro-
gesterone in progestational differentiation. *Biol.*
Reproduct. 5, 172-183, 1971.

V E R Z E I C H N I S

der Figuren, Abbildungen und Tabeller:	Seite
Fig. 1: Chromosomensatz von Mann und Frau	1
Fig. 2: HUBERMANN und RIGGS (1968): Schema der chromosomalen Replikation	3
Fig. 3: ^3H -Methyl-Thymidin	4
Fig. 4: Schema der Markierung unterschiedlich langer Abschnitte der späten S-Phase bei nicht vollständig synchronisierten Zell- kulturen	14
Fig. 5: Kennlinie der Plumbicon-Röhre	17
Fig. 6: CLASSIMAT, Meßprinzip: Flächenmessung durch integrierende Rasterpunktzählung; Zusammenhang zwischen Silberkornzählung und apparativer Flächenmessung	19
Fig. 7: Einzelwerte	27
Fig. 8: Mittelwerte und lineare Regression	28
Fig. 9: Abhängigkeit der Silberkornfläche von der Zahl in 10 Stichproben	29
Fig. 10: Vergleich der X-chromosomalen und autoso- malen Markierung einzelner Zellen bei A-P 15 weiblichen Individuen	32-39
Fig. 11: Mittlere X-chromosomale Markierung in Abhängigkeit vom Markierungsgrad der Autosomen (Mittelwertdiagramme)	
a) Altersgruppe 1	42
b) Altersgruppe 2	42
c) Altersgruppe 3	43
d) Zusammenfassung aller Einzelwerte der 3 Altersgruppen	43

Fig. 12:	X-chromosomale Markierung als Funktion der autosomalen Markierung (lineare Regression)	
a)	Altersgruppe 1	46
b)	Altersgruppe 2	46
c)	Altersgruppe 3	47
d)	lineare Regression der Mittelwerte der 3 Altersgruppen	47
Fig. 13:	Heterozyklierquotient, Häufigkeitsverteilung	51
Fig. 14:	Charakterisierung des X-chromosomalen Heterozyklierverhaltens nach GILBERT et al. (1962)	55
Fig. 15:	Verhältnis der X-chromosomalen zur autosomalen Markierung nach GILBERT et al. 1965	56
Fig. 16:	X-chromosomale Replikationsmuster (GIANNELLI 1970)	59
Fig. 17:	Schematischer Querschnitt durch eine chromosomenautoradiographie	65
- - - - -		
Abb. 1:	³ H-Thymidin-Autoradiographie einer menschlichen Metaphaseplatte zu einem späten Zeitpunkt der DNS-Replikation	5
Abb. 2:	Anhäufung von Silberkörnern über dem heterozyklischen X-Chromosom in Inter- phasekernen	6
Abb. 3:	CLASSIMAT (LEITZ)	16
Abb. 4a)	Monitorbild einer markierten Metaphase- platte	20
b)	Monitorbild mit Kennungssignal	21
c)	Erfassung der X-chromosomalen Markierung mit Hilfe von Maske und Kennungssignal	22

	Seite
Tab. 1: Übersicht der analysierten Kulturen	12
Tab. 2: Genauigkeit der GLASSIMATMESSUNG	24
Tab. 3: Homogenitätsprüfung (H-Test) für die X-chromosomale Heterozyklie aller Individuen	40
Tab. 4: Signifikanzberechnung (t-Test, U-Test) für die Unterschiede der X-chromosomalen Mar- kierung zwischen Altersgruppe 1 und 2	44
Tab. 5: Homogenitätsprüfung (H-Test) innerhalb der 3 Altersgruppen	49
Tab. 6: Signifikanzberechnung (U-Test) für die Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Heterozykliequotienten von Alters- gruppe 1 und 2	52
Tab. 7: Homogenitätsprüfung (H-Test) für die Heterozykliequotienten innerhalb der 3 Altersgruppen	53
Tab. 8: Schwankungen in der Silberkorngröße berechnet nach MERTZ (1969)	76

L e b e n s l a u f

Am 19.10.1946 wurde ich als Sohn des Privatlehrers Gerhard Gundlach und seiner Frau Ilse Gundlach, geborene Gutmann, in Marburg / Lahn, geboren. Meine Kinderstube teilte ich mit einer älteren und zwei jüngeren Schwestern sowie mit einem jüngeren Bruder.

Ab Oktober 1953 besuchte ich in Marburg die Volksschule, wechselte nach einem halben Jahr auf die Freie Waldorfschule/Marburg, über, an der ich Ostern 1966 mein Abitur ablegte.

Am 4.4.1966 wurde ich zum verkürzten Grundwehrdienst von 12 Monaten einberufen, den ich in Stadt Allendorf, Marburg, Koblenz und München absolvierte.

Danach begann ich in Marburg am 19.4.1967 das Studium der Humanmedizin. Am 13.3.1968 bestand ich mein Vorphysikum und am 27.9.1969 das Physikum.

Die klinischen Semester studierte ich gleichfalls in Marburg, wo ich am 5.12.1972 das Staatsexamen abschloss. Seit dem 5.1.1973 bin ich mit der Medizinalassistentin Eva-Maria Gundlach, geborene Lowes, verheiratet.

Ab 1.2.1973 arbeitete ich als Medizinalassistent in den Kliniken der Philipps-Universität Marburg (Neurologie und Psychiatrie, Medizinische Klinik, Chirurgie) bis zum 28.2.1974.

Meine akademischen Lehrer in Marburg / Lahn waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Arndt, Aurich, Barthelmai, Beckmann, Berendes, Bommer, Brück, Buchholz, Daume, Dittrich, Dimroth, Dölle, Exner, Friederich, Ganz, Golenhofen, Hamelmann, Hardewig, Hennessen, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt, Jort, Mupe, Ihm, Jacob, Kaifarnik, Karlson, Koecke, Koransky, Korb, Kunz, Kühnel, Linneweh, Lüdke, Mahr, Mann, Mannheim, Martini, Mattes, Nöth, Nesswetha, Neurath, Nultsch, Oepen, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen, Schaumlöffel, Schiff, Schimassek, Schleyer, Schmitz-Moormann, Schmid, Seidel, Sekeris, Siess, Spiegelberg, Straub, Strohmeyer, Stutte, Voss, Walcher, Wendt, Willenbockel, Zilliken, Braasch

